



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Biofísica, Facultat de Medicina

**Análisis del comportamiento de combinaciones de células
troncales y biomateriales mediante un procedimiento de
imagen fotónica no invasivo.**

Irene Román Dégano
Barcelona, abril del 2008



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Biofísica, Facultat de Medicina

Memoria presentada por Irene Román Dégano para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Ciencias Cardiovasculares de Catalunya (ICCC-CSIC-UAB), bajo la dirección de los Doctores Jerónimo Blanco Fernández y Nuria Rubio i Vidal y la tutoría del Doctor Joan Manyosa Ribatallada.

Director

Co-director

Jerónimo Blanco Fernández

Nuria Rubio i Vidal

Tutor

La interesada

Joan Manyosa Ribatallada

Irene Román Dégano

Barcelona, abril del 2008

A mi familia, a mis amigos,
a Álex y a mí.

“La música de mi vida”

La oigo, suave,
melodía dulce que perfuma el aire
y la siento, poderosa
y fuerte,
mientras golpea con sus notas
las casas y la gente.
La escucho y salgo a la calle
y bailo sin fuerzas
y canto dormida,
como presa de un conjuro,
o de una alegre mentira.
Y guiada por las notas
salgo del invierno,
eterno frío que me envuelve,
y me agarrota
del pelo hasta los dedos.
Y siento el calor en mi pecho
y bailo loca
bajo lluvia, nieve y viento,
bajo el frío y la humedad,
que no se van
pero que no me tocan.

“La política es para el momento, una ecuación es para la eternidad”

Albert Einstein.

Índice

Índice	1
Abreviaturas	11
Resumen	17
Prólogo	21
Introducción	27
1. El tejido óseo	29
1.1. Composición, estructura y función.....	29
1.1.1. La matriz extracelular.....	29
1.1.2. Células del tejido óseo.....	31
1.1.3. Tipos de tejido óseo.....	33
1.2. Histogénesis del hueso.....	36
1.2.1. Formación del tejido óseo.....	36
1.2.1.1. Osificación intramembranosa	37
1.2.1.2. Osificación endocondral, crecimiento y remodelado óseo.....	38
1.2.2. Mineralización del tejido óseo.....	40
1.2.3. Reparación del tejido óseo	41
1.3. Tratamientos utilizados en las lesiones del tejido óseo	42
1.3.1. Injertos de hueso	42
1.3.2. Sustitutos de hueso	43
1.3.2.1. Materiales osteoconductivos.....	44
1.3.2.2. Agentes osteoinductivos	46
2. Ingeniería de tejidos	48
2.1. Tipos celulares	49
2.1.1. Células troncales embrionarias (CTEs)	50
2.1.2. Células troncales adultas (CTAs)	52
2.1.2.1. Células mesenquimales (MSCs).....	52

2.1.2.2. Células progenitoras multipotentes adultas (MAPCs)	55
2.1.2.3. Células de cordón umbilical	56
2.1.3. Células troncales cancerosas	56
2.2. Biomateriales	57
2.2.1. Materiales para la reparación del tejido óseo	58
2.2.1.1. Materiales metálicos	59
2.2.1.2. Materiales cerámicos	59
2.2.1.3. Polímeros	60
2.2.1.3.1. Polímeros naturales	61
2.2.1.3.2. Polímeros sintéticos	66
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> del implante	69
3. Monitorización del implante	71
3.1. Monitorización <i>in vitro</i>	71
3.2. Monitorización <i>in vivo</i> , técnicas de imagen	73
3.2.1. Tomografía por emisión de positrones (PET)	74
3.2.2. Tomografía computerizada (CT)	75
3.2.3. Técnicas ópticas de imagen	76
3.2.4.1. Fluorescencia	76
3.2.4.3. Luminiscencia	78
Objetivos	83
Materiales y métodos	87
1. Tipos celulares	89
1.1. Células C3H/10T1/2	89
1.2. Células C57BL/6	89
1.3. Células BMC-9	90
1.4. Células mesenquimales de médula ósea humana (hBMSCs)	90
1.5. Células mesenquimales de tejido adiposo humano (hAMSCs)	91

1.6. Células 293 GPG.....	92
1.7. Células 293 T.....	92
2. Diferenciación de las células en cultivo.....	94
2.1. Diferenciación a tejido adiposo.....	94
2.2. Diferenciación a hueso.....	94
2.3. Diferenciación a cartilago.....	95
3. Producción vírica y marcaje.....	97
3.1. Marcaje retrovírico.....	97
3.1.1. Producción de partículas retrovíricas.....	97
3.1.2. Producción de células establemente marcadas con genes de interés ...	98
3.2. Marcaje lentivírico.....	99
3.2.1. Producción de partículas lentivíricas.....	99
3.2.2. Producción de células establemente marcadas con genes de interés .	101
3.3. Selección de las células marcadas.....	101
3.4. Curvas estándar <i>in vitro</i>	102
3.5. Seguimiento del marcaje <i>in vitro</i>	102
3.5.1. Cuantificación de ADN de cultivo celular.....	103
4. Biomateriales de soporte para el crecimiento celular.....	104
4.1. Hidrogel de gelatina-glutaraldehído.....	104
4.2. Hidrogel peptídico de RAD16-I.....	104
4.3. Hidrogel de PEG.....	106
4.4. Hidrogel de PEG-RGD.....	107
4.5. Esferas de alginato.....	109
4.6. Esferas Cytodex™ 3.....	109
4.7. Esferas PAMs.....	110
4.8. Soporte de quitosano.....	111
4.9. Monitorización de la proliferación celular en los biomateriales <i>in vitro</i>	112

5. Modelos animales	113
5.1. Tipos de ratones utilizados	113
5.2. Modelo ectópico	114
5.2.1. Seguimiento de células sembradas en biomateriales.....	114
5.1.2. Biocompatibilidad de materiales	115
5.2. Modelo de lesión ósea	115
5.2.1. Seguimiento de células sembradas en biomateriales.....	115
5.2.2. Comportamiento de las células del huésped	116
5.2.2.1. Generación de la colonia de ratones C57BL/6 transgénicos	116
5.3. Modelo de transformación celular	117
6. Bioluminiscencia no invasiva (BLI)	118
6.1. Metodología.....	118
6.1.1. Imágenes adquiridas.....	119
6.2. Cuantificación de las imágenes y análisis	119
6.3. Curvas estándar <i>in vivo</i>	120
7. Tomografía axial computerizada (TAC)	121
7.1. Metodología.....	121
7.2. Cuantificación de las imágenes y análisis	121
8. Preparación de explantes y migración celular	122
8.1. Obtención de los explantes	122
8.2. Migración celular. Metodología	122
8.2.1. Cálculo del número de células en los órganos/tejidos	123
9. Técnicas histológicas	124
9.1. Muestras de diferenciaciones <i>in vitro</i>	124
9.1.1. Tinción de Von Kossa para hueso sobre células en placa	125
9.1.2. Tinción de Rojo de Alizarina S para hueso sobre células en placa	125
9.1.3. Tinción de oil red O para lípidos sobre células en placa	126

9.1.4. Tinción de Azul de Alcían para cartílago sobre células en placa.....	126
9.1.5. Tinción de Azul de Toluidina para cartílago sobre cortes	127
9.2. Muestras de animales	128
9.2.1. Inclusión en OCT y preparación de bloques y cortes	128
9.2.2. Inclusión en parafina.....	128
9.2.2.1. Decalcificación	129
9.2.3. Tinciones histológicas básicas.....	130
9.2.3.1. Hematoxilina-eosina (HE)	130
9.2.3.2. Tricrómico de Masson.....	131
9.2.4. Tinciones de inmunohistoquímica.....	132
9.2.4.1. Tinción de detección de biotina	132
9.2.4.2. Tinción de detección de EGFP	133
Resultados	135
Capítulo I	139
1. Análisis del comportamiento de las células C3H/10T1/2 sembradas en biomateriales.....	141
1.2. Caracterización de las células C3H/10T1/2.....	141
1.2. Producción de luz de las células C3H/10T1/2.....	142
1.2.1. Producción de luz <i>in vitro</i>	142
1.2.2. Producción de luz <i>in vivo</i>	143
1.3. Proliferación de las células G-Luc-C3H/10T1/2 <i>in vitro</i>	144
1.4. Proliferación de las células G-Luc-C3H/10T1/2 <i>in vivo</i>	146
1.5. Migración de las células implantadas	149
1.6. Examen macro y microscópico de la zona de implantación	149
1.7. Recuperación de las células de los implantes y estabilidad de la expresión de EGFP y PLuc.....	151

2. Análisis de la proliferación de células C57BL/6 en un soporte de estructura nanofibrilar	154
2.1. Producción de luz de las células C57BL/6	154
2.1.1. Producción de luz <i>in vitro</i>	154
2.1.2. Producción de luz <i>in vivo</i>	155
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de las células G-Luc-C57BL/6 sembradas en los soportes....	156
2.3. Proliferación de las células G-Luc-C57BL/6 sembradas en hidrogeles RAD16-I o RAD16-I+ <i> biorubber in vivo</i>	157
2.4. Migración de las células implantadas	160
2.5. Respuesta de los ratones BALB/c a los materiales implantados	160
2.6. Análisis histológico de los implantes en ratones BALB/c nu/nu	161
Capítulo II	163
1. Análisis de la implantación de hMSCs en un modelo de lesión ósea	165
1.1. Caracterización de las células hMSCs <i>in vitro</i>	165
1.2. Producción de luz por las células G-Luc-hAMSCs y G-Luc-hBMSCs.	167
1.2.1. Producción de luz <i>in vitro</i>	167
1.2.2. Producción de luz <i>in vivo</i>	168
1.3. Análisis de la capacidad de proliferación de las células G-Luc-hAMSCs y G-Luc-hBMSCs <i>in vivo</i>	169
1.4. Tomografía axial computerizada (TAC).....	171
1.5. Migración de las células implantadas	174
1.6. Histología	174
1.7. Migración de las células del huésped	176
Capítulo III	179
1. Análisis de la proliferación de las células BMC-9 <i>in vivo</i>	181
1.1. Producción de luz de las células BMC-9.....	182
1.2. Proliferación de las G-Luc-BMC-9 <i>in vivo</i>	183

1.3. Migración de las células implantadas	184
1.4. Explantes.....	184
1.5. Histología	186
2. Análisis del potencial oncológico de las células BMC-9 <i>in vivo</i>.....	186
2.1. Caracterización de las células BMC-9.....	186
2.2. Potencial oncológico y/o metastático de las células BMC-9.....	187
<i>Discusión</i>	191
<i>Conclusiones</i>	207
<i>Referencias</i>	211
<i>Agradecimientos</i>	231
<i>Publicaciones</i>	247

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Alfa-MEM	<i>Modified Eagle's Medium, alfa modification</i>
AMO	Aspirado de médula ósea
ATCC	Colección americana de tipos celulares
ATP	Adenosina trifosfato
Ba	Bario
BLI	Bioluminiscencia no invasiva
BMP-2	Proteína morfogenética del hueso-2
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CCD	Dispositivo de acoplamiento de carga o <i>charged coupled device</i>
CD105	Endoglina, componente regulador de complejo del receptor TGF- β
CD106	Molécula de adhesión VCAM-1 involucrada en la migración celular
CD11	Subunidad de la glicoproteína de membrana LFA-1 que promueve la adhesión célula-célula al interactuar con la glicoproteína de membrana ICAM-1
CD14	Proteína de membrana que se une a los lipopolisacáridos bacterianos
CD166	Molécula de adhesión ALCAM
CD18	Molécula de adhesión y señalización en el sistema hematopoyético
CD29	Integrina AKA β -1
CD31	Molécula de adhesión celular PECAM-1
CD34	Marcador de adhesión de células troncales presente en los precursores hematopoyéticos
CD40	Proteína coestimuladora

CD44	Familia de moléculas de adhesión a la matriz extracelular, formada por <i>splicing</i> alternativo, que se adhiere al ácido hialurónico, colágeno, laminina y fibronectina
CD45	Proteína transmembrana presente en la mayoría de las células hematopoyéticas
CD54	Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)
CD56	Molécula de adhesión neuronal-1 (NCAM-1)
CD71	Receptor de la transferrina
CD73	Proteína ecto-5'-nucleotidasa
CD80	Molécula coestimuladora
CD86	Molécula coestimuladora
CD90	Antígeno celular Thy-1
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Tomografía computerizada
CTAs	Células troncales adultas
CTEs	Células troncales embrionarias
DAB	Diaminobencidina
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagle's Medium</i>
DsRed	Proteína roja fluorescente
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada
FACS	Clasificador de proteínas fluorescentemente activadas
FBS	Suero bovino fetal
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos-2
GFP	Proteína verde fluorescente
hAMSCs	Células mesenquimales derivadas de tejido adiposo
hBMSCs	Células mesenquimales derivadas de médula ósea
HCl	Ácido clorhídrico

HE	Hematoxilina-eosina
HeBS	Solución amortiguadora de hepes
hMSCs	Células mesenquimales humanas
HRP	Peroxidasa sérica de caballo
IM	Intramuscular
MAPCs	Células progenitoras multipotentes adultas
MHC-I	Familia de proteínas de membrana heterodiméricas de unión a péptidos presentes en todas las células del organismo
MHC-II	Familia de proteínas de membrana heterodiméricas de unión a péptidos presentes en las células presentadoras de antígenos
MMP	Metaloproteasas de la matriz extracelular
MOD	Matriz ósea desmineralizada
MOI	Partículas víricas infecciosas/célula
MSCs	Células mesenquimales
MSCs	Células mesenquimales
Na ₂ HPO ₄	Ortofosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro sódico
Oct-4	Factor de transcripción Octamer-4 perteneciente a la familia POU. Esta proteína esta relacionada con la auto-renovación y estado indiferenciado de las CTEs.
P/S	Penicilina/Estreptomina
PAMs	Esferas farmacológicamente activas
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG	Polietilenglicol
PEG-RGD	Polietilenglicol con péptidos RGD covalentemente unidos
PET	Tomografía por emisión de positrones
PFA	Paraformaldehído

PHCs	Cuentas fotónicas
PLGA	Copolímero de ácido láctico y glicólico
PLuc	Luciferasa de <i>Photinus Pyralis</i>
RGD	Tripéptido de arginina, glicina y ácido aspártico
RLB	Solución de lisado celular
RLuc	Luciferasa de <i>Renilla Reniformis</i>
RLUs	Unidades relativas de luz
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SC	Subcutáneo
Stro-1	Proteína de membrana celular expresada por MSCs y precursores hematopoyéticos
TAC	Tomografía axial computerizada
TEOA	Trietanolamina
TFC	Trifosfato de calcio
TGF- β 1	Citocina perteneciente a la superfamilia del <i>transforming growth factor-β</i>
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VSV-G	Proteína de envuelta del virus de la estomatitis vesicular

Resumen

En los últimos años se ha producido un gran desarrollo de las técnicas relacionadas con la terapia celular. Actualmente es posible aislar células progenitoras de numerosos tejidos humanos adultos que pueden dar lugar a múltiples linajes celulares.

Además, la investigación en biomateriales ha experimentado una importante expansión, generando una gran variedad de soportes de diferente naturaleza físico-química. La combinación del tipo celular y el biomaterial adecuados, junto con factores de crecimiento específicos, podría ser una alternativa a las terapias actuales para lograr la reparación de determinados tejidos de escasa capacidad de autoregeneración.

En esta tesis se describe la aplicación de una plataforma basada en la detección de células, que expresan constitutivamente los genes de la proteína verde fluorescente y la luciferasa de *Photinus Pyralis*, mediante procedimientos de bioluminiscencia no invasiva para la selección de los biomateriales que mejor inducen la proliferación *in vivo* de las líneas celulares C3H/10T1/2 y C57BL/6 en un modelo ectópico y para la evaluación de la proliferación y diferenciación de células mesenquimales humanas (hMSCs), obtenidas de diferentes tejidos, en un modelo de lesión ósea.

Los resultados obtenidos demuestran que las células sembradas en biomateriales implantados en ratones inmunodeprimidos pueden ser detectadas durante un mínimo de 12 semanas, mostrando una mejor proliferación en los implantes colocados intramuscularmente que en los implantes subcutáneos. Este modelo ectópico permitió seleccionar un biomaterial basado en macrómeros de polietilenglicol (PEG) unidos a péptidos RGD (arg-gly-asp) que potencia la proliferación celular *in vivo*. Posteriormente este material (PEG-RGD) se sembró con hMSCs y se evaluó en un modelo de lesión ósea, en el hueso de la bóveda craneal de ratones inmunodeprimidos, que mostró una mejor supervivencia de las hMSCs obtenidas de médula ósea frente a las hMSCs obtenidas de tejido adiposo. Se observó además, mediante tomografía axial computerizada, que la densidad de los defectos óseos en los que se colocaron implantes de PEG-RGD aumentó significativamente respecto al grupo control.

La plataforma desarrollada podría tener una gran utilidad para analizar cuestiones relacionadas con la utilización de las células troncales en la reparación de tejidos, tales como el tipo celular óptimo, las condiciones de expansión *in vitro* o la inducción de diferenciación. Además es un procedimiento simple, altamente sensible y permite analizar el mismo animal durante largos períodos de tiempo, mejorando así la consistencia de los resultados obtenidos y reduciendo el número de animales utilizados.

Prólogo

Los datos de la Organización Nacional de Transplantes¹ muestran que en 2006 se realizaron 15516 transplantes:

Tipo de transplante	Número de transplantes realizados
Cardíaco	274
Corazón-pulmón	8
Cornea	2806
Cultivos celulares	108
Hígado	1051
Intestino	7
Membrana amniótica	809
Páncreas	94
Pulmón	169
Progenitores hematopoyéticos	1974
Renal	2157
Segmentos vasculares	112
Transplante de tejido osteo-tendinoso	5749
Válvulas cardíacas	134
Total	15516

Tabla 1. Transplantes realizados en España en el 2006 según la Organización Nacional de Transplantes.

Sin embargo, estos datos reflejan sólo una parte de los pacientes que sufren pérdida o fallo de órganos anualmente, los demás pacientes siguen tratamientos farmacológicos, se someten a reconstrucciones quirúrgicas o utilizan dispositivos externos como los dializadores de riñón³.

Esto supone un elevado coste para la sanidad, debido al gran número de intervenciones quirúrgicas y a los días de hospitalización que requieren los enfermos. Según el Ministerio de Sanidad y Consumo², el 54,46% del gasto anual sanitario (50.053,25 millones de euros en el último ejercicio) corresponde a la asistencia hospitalaria y a la asistencia especializada.

Además, las terapias actuales para los pacientes que sufren disfunción de órganos, tienen una serie de limitaciones:

- a) Los trasplantes dependen de las donaciones y, aunque las donaciones de órganos y tejidos aumentan anualmente, y España es el país en que más donaciones se hacen en Europa¹, éstas siguen siendo insuficientes para tratar a todos los pacientes que necesitan un trasplante.
- b) Las reconstrucciones quirúrgicas a menudo conllevan problemas a largo plazo y los dispositivos externos no pueden llevar a cabo todas las funciones de un órgano/tejido y por lo tanto, no pueden detener el progresivo deterioro del paciente³.

Concretamente, los trasplantes de tejido osteotendinoso representan el 37,1% del total de los trasplantes realizados en el 2006 (Tabla 1), siendo el tipo de trasplante más frecuente¹. Las personas hospitalizadas por enfermedades del aparato músculo-esquelético y de los tejidos conectivos representan el 5,2% de las mujeres y el 4,6% de los hombres, siendo en ambos la octava (de dieciocho) causa de hospitalización². Además, según el informe de la salud laboral en España del 2006⁴, en la estimación de los casos incidentes de enfermedades laborales, las enfermedades osteo-musculares representan el 35%, siendo la causa más común de enfermedad laboral.

Los desórdenes degenerativos relacionados con la edad, como la osteoporosis y la osteoartritis, tienen un alto impacto socio-económico, concretamente 30 millones de personas sufren estas patologías en Europa. El incremento en la esperanza de vida,

entre otros factores, ha causado un incremento dramático en el número de personas que padecen osteoporosis y osteoartritis en las últimas décadas. Estudios sobre la prevalencia de la osteoartritis muestran que el 12% de la población entre 25-74 años y el 95% de la población que supera los 60-70 años, la padecen⁵

Se han producido grandes avances en los tratamientos de fracturas complejas y articulaciones y los pacientes con este tipo de lesiones tienen ahora numerosas opciones terapéuticas, por ejemplo, los injertos de hueso, que representan una de las estrategias actuales para la reparación de grandes defectos óseos y fracturas. Sin embargo, los tratamientos actuales no permiten la recuperación completa del tejido, por ejemplo el riesgo de fractura de un individuo con una fractura osteoporótica previa⁶ es 2,2 veces mayor que la de un individuo sin dicho antecedente.

Por estos motivos se están desarrollando nuevos tratamientos, incluyendo el uso de biomateriales, células troncales y factores de crecimiento como alternativas potenciales a las terapias actuales⁷.

“La ciencia no sirve sino para darnos una idea de cuan vasta es nuestra ignorancia”

Félicité de Lammenais

Introducción

1. El tejido óseo

1.1. Composición, estructura y función

El tejido óseo es el constituyente principal del esqueleto y desempeña importantes funciones, entre las que destacan: ser el soporte de los tejidos blandos del organismo, proteger los órganos vitales, alojar a la médula ósea, proporcionar apoyo a los músculos esqueléticos, constituir un sistema de palancas que amplía las fuerzas generadas en la contracción muscular y ser un depósito de calcio, fosfato y otros iones⁸. A pesar de su resistencia y dureza, el hueso es un tejido dinámico, que se renueva continuamente y que experimenta una constante reconstrucción durante toda la vida.

El hueso, como el resto de tejidos conjuntivos, está formado por una matriz extracelular donde se encuentran los diferentes tipos celulares, pero en este caso, sus componentes extracelulares están calcificados. Según la densidad de esta matriz el hueso es compacto, de gran densidad, o esponjoso⁹. En el tejido óseo, ambos tipos de hueso son adyacentes sin un límite que los separe. Los huesos poseen un revestimiento, en sus superficies externa (periostio) e interna (endostio), de tejido conjuntivo compuesto por células osteogénicas. Las principales funciones de estos dos revestimientos son la nutrición del tejido óseo y el suministro de células para el crecimiento y la regeneración del hueso.

En los siguientes apartados se describen los componentes principales del tejido óseo.

1.1.1. La matriz extracelular

La matriz ósea tiene una gran durabilidad y estabilidad y está formada por un componente orgánico y uno inorgánico. El componente orgánico proporciona la forma del hueso y contribuye a su capacidad para resistir las tensiones, mientras que el componente inorgánico o mineral proporciona la resistencia a la compresión.

El **componente orgánico** está compuesto principalmente por colágeno de tipo I y por pequeñas cantidades de colágeno de tipo V y XII. Los diferentes tipos de colágeno representan el 85-90% de la matriz orgánica. El 10% restante consiste en otras glucoproteínas no colágenas específicas del tejido óseo¹⁰

La unidad esencial del colágeno está constituida por tres cadenas polipeptídicas que forman una triple hélice, el tropocolágeno (Fig.1). Las macromoléculas de tropocolágeno se agrupan constituyendo las fibras de colágeno. Concretamente, el colágeno de tipo I se caracteriza por la composición de la molécula de tropocolágeno está constituida por dos cadenas α_1 idénticas y una cadena α_2 . Se ha descrito¹¹ que mutaciones heterocigotas en los genes del colágeno tipo IA1 y tipo IA2, que codifican respectivamente las cadenas α_1 y α_2 , causan la osteogénesis imperfecta.

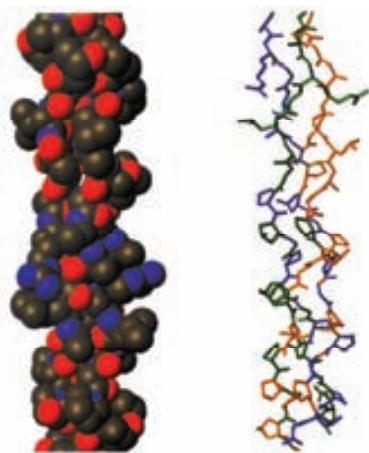


Fig. 1. Estructura de la triple hélice de tropocolágeno.

El componente orgánico contiene además una variedad de proteínas distintas del colágeno que influyen la organización de la matriz, la mineralización del hueso y el comportamiento de las células del tejido óseo. Estas proteínas incluyen la osteocalcina, proteínas implicadas en la adhesión celular como la osteonectina y la sialoproteína del hueso, fosfoproteínas del hueso implicadas en el inicio de la mineralización y pequeños proteoglicanos como el biglicano y la decorina. La matriz

ósea también contiene factores de crecimiento¹², tales como las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y las interleucinas 1 y 6 entre otras, que influyen en la función de las células del tejido óseo.

El **componente inorgánico o fase mineral**, sirve de reservorio de iones y proporciona al tejido óseo la mayor parte de su rigidez y resistencia¹³. Aproximadamente el 99% del calcio, el 85% del fósforo y entre el 40% y el 60% del sodio y magnesio del organismo están asociados a la fase mineral del hueso.

La rigidez la confieren cristales de calcio similares químicamente a la hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ que contienen iones carbonato y grupos HPO_4^{-2} ¹⁴.

1.1.2. Células del tejido óseo

Como el resto de tejidos conjuntivos, pero contrariamente a la mayoría de tejidos, el tejido óseo contiene pocas células por unidad de volumen¹⁴.

Las células del tejido óseo llevan a cabo las funciones de formación, reabsorción y reparación del hueso y homeostasis mineral. Se originan a partir de dos linajes celulares, uno mesenquimal y otro hematopoyético¹⁵. El linaje mesenquimal da lugar a células indiferenciadas o preosteoblastos, osteoblastos, células del borde del hueso y osteocitos, mientras que el linaje hematopoyético da lugar a preosteoclastos y osteoclastos.

Los **preosteoblastos o células osteogénicas** residen en el endostio, el periostio y la médula ósea¹⁴. Tienen una forma irregular y un solo núcleo. Se mantienen en estado indiferenciado hasta que son estimulados a proliferar y a diferenciarse a osteoblastos, por ejemplo, después de una fractura.

Los **osteoblastos** se encuentran en la superficie de los huesos en crecimiento y cuando están activos les rodea una laguna de componente orgánico de la matriz (osteoides) que los separa de la matriz mineralizada. Son los responsables de la síntesis y la secreción de la fase orgánica de la matriz ósea¹⁶, produciendo colágeno

de tipo I y glucoproteínas. También pueden concentrar fosfato cálcico participando así en la mineralización de la matriz. Los osteoblastos activos pueden seguir tres destinos: permanecer en la superficie del hueso, manteniendo una baja actividad sintética, y dar lugar a las células del borde del hueso, rodearse de matriz mineralizada y dar lugar a osteocitos, con los que mantienen contacto a través de los canaliculos (Fig. 2) o desaparecer de los lugares de formación ósea¹⁷.

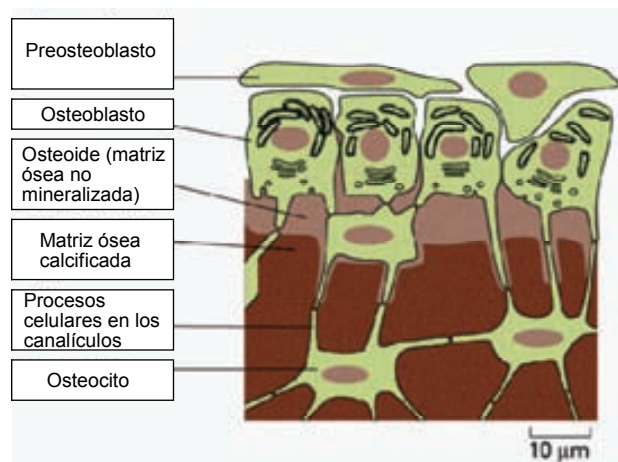


Fig. 2. Esquema de la diferenciación de los preosteoblastos o células osteogénicas en células maduras del tejido óseo.

Las **células del borde del hueso**, también denominadas osteoblastos inactivos o osteocitos de superficie, tienen forma alargada y extensiones citoplasmáticas que penetran en la matriz ósea y contactan con las extensiones citoplasmáticas de los osteocitos¹⁸. Estas células, al igual que los osteocitos, tienen menos citoplasma y orgánulos que los osteoblastos activos. Su función parece ser la de atraer a los osteoclastos, mediante la reabsorción del osteoide que cubre la matriz mineralizada¹⁷, a sitios específicos y estimularlos para que lleven a cabo la reabsorción ósea.

Los **osteocitos** representan el 90% de las células óseas en el esqueleto maduro. Están alojados en lagunas de matriz ósea mineralizada y conectados entre sí mediante prolongaciones celulares¹⁹. Las interconexiones entre osteocitos, osteoblastos y

células del borde del hueso permiten, a esta red celular, detectar la deformación del hueso, entre otros procesos y coordinar la formación y la reabsorción del hueso, así como el flujo de iones entre la matriz ósea y los fluidos extravasculares del hueso.

Los **preosteoclastos** son precursores mononucleares de la médula ósea que se encuentran en la médula o en la sangre. Al ser estimulados proliferan, migran al tejido óseo y se fusionan dando lugar a los osteoclastos multinucleados.

Los **osteoclastos** que pueden tener entre 20 y 30 núcleos y un gran número de mitocondrias y lisosomas se encuentran en los lugares de reabsorción del hueso²⁰. Para destruir la matriz ósea, los osteoclastos se unen a la superficie del hueso, formando un espacio cerrado entre la célula y el hueso. A la vez, los endosomas que contienen bombas de protones de membrana, migran a la zona de la célula más próxima al hueso y se insertan en la membrana. Esto provoca una bajada del pH de 7 a 4 en el espacio cerrado entre el osteoclasto y el hueso^{21,22} que solubiliza la fase mineral del hueso. Para degradar la fase orgánica del hueso, los osteoclastos secretan proteasas ácidas y fagocitan fragmentos de matriz que degradan en las vacuolas citoplasmáticas. Una vez los osteoclastos han completado la reabsorción, se dividen en células mononucleares, en espera de ser reactivadas para formar nuevos osteoclastos.

La osteopetrosis es una muestra de los efectos adversos de una inadecuada o inefectiva función de los osteoclastos²³. En esta enfermedad, el hueso es extremadamente denso y duro y la médula ósea está mayoritariamente ocupada por cartílago calcificado, tejido fibroso y tejido óseo.

1.1.3. Tipos de tejido óseo

Desde el punto de vista histológico se distinguen dos tipos de hueso: el hueso compacto y el hueso esponjoso (Fig. 3). Ambos tienen la misma composición, aunque difieren en su densidad, el hueso compacto tiene un 10% de porosidad mientras que el

hueso esponjoso tiene entre un 50 y un 90% de porosidad¹⁵. Al ser la resistencia a la compresión proporcional a la densidad, ésta es 10 veces mayor en el hueso compacto que en el hueso esponjoso por unidad de volumen.

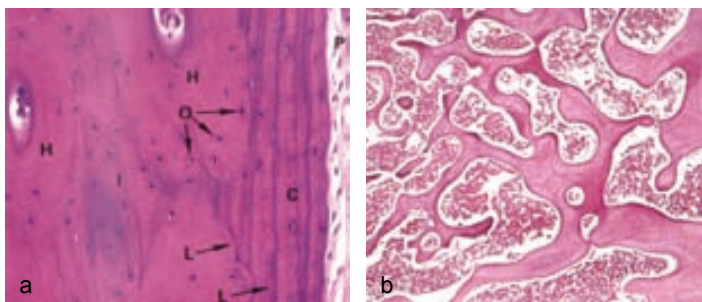


Fig. 3. Tinción de HE en muestras de tejido óseo compacto (a) aumento x 198, y esponjoso (b) aumento x 50. En la fotografía (a) se pueden identificar los sistemas de Havers (H), los osteocitos (O) y las laminillas de hueso cortical (C,L). En la fotografía (b) se observan las trabéculas características del hueso esponjoso rodeando la médula ósea.

El hueso compacto forma aproximadamente el 80% del esqueleto adulto¹⁷ y rodea la médula ósea. Este tipo de hueso está organizado (Fig. 4) en columnas óseas paralelas que constan de capas óseas concéntricas o laminillas dispuestas alrededor de un canal central que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios²⁴.

El hueso esponjoso está compuesto por una red de trabéculas óseas separadas por espacios laberínticos comunicados que contienen la médula ósea. Las células del hueso esponjoso se encuentran en las trabéculas o en su superficie, pudiendo estar influenciadas por las células de la médula ósea, a diferencia del hueso compacto donde la mayoría de las células está completamente rodeada de matriz²⁵. Esta diferente distribución celular determina que el hueso esponjoso tenga una tasa metabólica y de remodelación más elevada que el hueso compacto.

Los huesos también pueden clasificarse según su morfología en huesos largos, cortos y planos.

En los huesos largos (Fig. 5), como el fémur o la tibia, los extremos o epífisis están formados por hueso esponjoso con una delgada capa superficial compacta y la parte

cilíndrica o diáfisis está formada casi totalmente por hueso compacto que proporciona la máxima resistencia a la torsión²⁶. Los huesos cortos, por ejemplo los carpianos (huesos de la mano y la muñeca) y los tarsianos (huesos del pie y el tobillo), tienen el centro compuesto por hueso esponjoso y se encuentran recubiertos en toda su periferia por una capa de hueso compacto. Los huesos planos, que se encuentran en las costillas y en el cráneo, están formados por dos capas de hueso compacto separadas por hueso esponjoso.

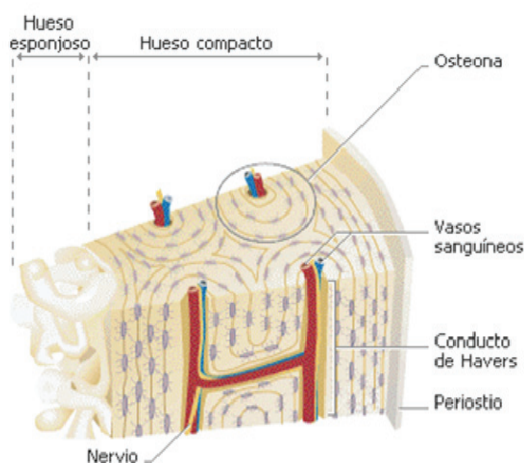


Fig. 4. Esquema de la estructura del hueso compacto.

Según la orientación de las fibras de colágeno se diferencian el hueso inmaduro o primario y el hueso laminar o secundario. El hueso inmaduro forma el esqueleto del embrión que posteriormente es reabsorbido y reemplazado por hueso laminar. Ambos tipos de hueso difieren en su formación, composición, organización y propiedades mecánicas. En el hueso inmaduro, las fibras de colágeno se disponen irregularmente mientras que en el laminar, las fibras de colágeno están organizadas en láminas de 3 a 7 μm de grosor que pueden permanecer paralelas las unas a las otras o disponerse en capas concéntricas en torno a los conductos con vasos, formando los denominados sistemas de Havers⁸.

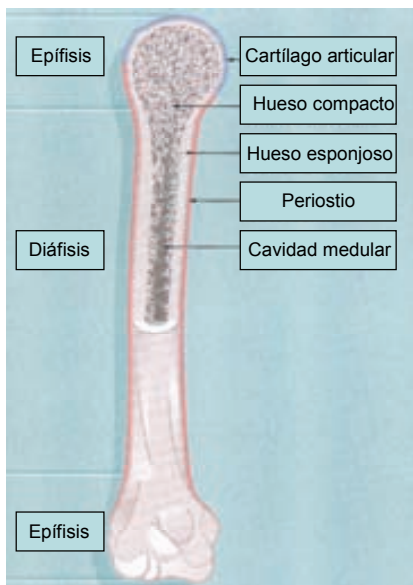


Fig. 5. Diagrama de la estructura general de los huesos largos en el esqueleto adulto.

El hueso inmaduro tiene una tasa metabólica superior a la del hueso laminar y un número de osteocitos 4 veces más elevado por unidad de volumen. Además, debido al alto contenido celular y de agua del hueso inmaduro, éste es más flexible y elástico que el hueso laminar.

Pequeñas cantidades de hueso inmaduro forman parte de los tendones y ligamentos y de las suturas de los huesos del cráneo. Con estas excepciones, el hueso inmaduro raramente está presente en el esqueleto normal humano a partir de los 5 años. Sin embargo, puede aparecer en respuesta a lesiones óseas¹⁵.

1.2. Histogénesis del hueso

1.2.1. Formación del tejido óseo

El tejido óseo se desarrolla por sustitución de un tejido conjuntivo preexistente. En el embrión se observan dos tipos de osteogénesis: la osificación intramembranosa, en la que la formación del hueso tiene lugar sobre un tejido conjuntivo primitivo y la

osificación endocondral, en la que la formación del hueso se realiza sobre tejido cartilaginoso previo.

1.2.1.1. Osificación intramembranosa

Este proceso empieza cuando el tejido conjuntivo se condensa en una capa altamente vascularizada, en la cual las células se unen mediante largas prolongaciones y depositan fibras de colágeno orientadas al azar en el espacio intercelular¹⁷. El primer signo de formación de hueso, consiste en la aparición de unas bandas de matriz ósea más densa (trabéculas) que tienden a depositarse en puntos equidistantes de los vasos, formando una estructura reticular. Paralelamente se producen cambios en las células del tejido conjuntivo vecino, las cuales se sitúan en la superficie de las trabéculas y se vuelven basófilas. Estas células dan lugar a osteoblastos que depositan nueva matriz ósea que permite el engrosamiento de las trabéculas. Los osteoblastos también secretan glucoproteínas de la matriz y moléculas de colágeno que polimerizan extracelularmente y forman una red de fibras de colágeno dispuestas al azar. Este primer hueso formado es el hueso inmaduro o primario. La matriz ósea depositada por los osteoblastos se mineraliza posteriormente y algunos osteoblastos dan lugar a osteocitos que quedan atrapados en esta matriz. Sin embargo, estos osteocitos mantienen contacto con los osteoblastos mediante delgadas prolongaciones, los canalículos, que quedan rodeados de matriz ósea^{26,27}.

En las zonas de hueso inmaduro destinadas a dar lugar a hueso compacto, las trabéculas continúan engrosándose hasta que desaparecen prácticamente los espacios que rodean los vasos y las fibras de colágeno de las capas del hueso depositadas sobre las trabéculas adquieren una estructura más ordenada. En las zonas de hueso inmaduro destinadas a dar lugar a hueso esponjoso, termina el engrosamiento de las trabéculas y el tejido vascular interpuesto se transforma en tejido hematopoyético^{28,29}.

El tejido conjuntivo que rodea el hueso en crecimiento se condensa formando el periostio, mientras que los osteoblastos situados en la superficie de las trabéculas dan lugar a células osteoprogenitoras.

Este es el proceso mediante el cual se forman ciertos huesos planos del cráneo como el frontal, los parietales, los temporales, los occipitales y parte de la mandíbula.

1.2.1.2. Osificación endocondral, crecimiento y remodelado óseo

En una primera fase, los condrocitos de la parte central del modelo cartilaginoso del hueso o porción media del tallo se hipertrofian y acumulan glucógeno en su interior formando un centro de osificación endocondral^{28,29} (Fig. 6). La matriz cartilaginosa se reduce y en ella se deposita fosfato de calcio, que provoca la degeneración y muerte de los condrocitos hipertróficos³⁰. Paralelamente se activa la capacidad osteogénica de las células del pericondrio, membrana de tejido conjuntivo que rodea el cartílago hialino y elástico, que depositan una delgada capa de tejido óseo alrededor de la porción media del tallo dando lugar al periostio. Los vasos sanguíneos del periostio crecen hacia la diáfisis e invaden la matriz cartilaginosa, se ramifican y forman asas capilares que se extienden hacia los extremos del cartílago calcificado.

Se produce posteriormente la migración de células progenitoras al interior del cartílago, las cuales dan lugar a los elementos hematopoyéticos de la médula ósea o a osteoblastos³¹. Los osteoblastos, se disponen sobre las espículas de matriz cartilaginosa calcificada y depositan matriz ósea sobre ellas formando trabéculas óseas.

En una segunda fase, los condrocitos de las epífisis se hipertrofian y dan lugar al centro de osificación epifisario. Los vasos sanguíneos y el tejido osteogénico proveniente del pericondrio invaden estas zonas estableciendo los centros secundarios de osificación. La expansión de los centros secundarios sustituye todo el cartílago epifisario con excepción del que persiste en forma de cartílago articular y de los discos entre la epífisis y la diáfisis (placa epifisaria). El crecimiento en longitud de

los huesos, es el resultado de la multiplicación continuada de las células cartilaginosas de la placa epifisaria que son sustituidas por hueso a medida que se alejan de la diáfisis^{32,33}. Al final del período de crecimiento, la proliferación de los condrocitos disminuye hasta cesar. Esto produce una continua sustitución del tejido cartilaginoso por hueso que concluye con la eliminación de la placa epifisaria.

Los huesos de la base del cráneo, de la columna vertebral, de la pelvis y de las extremidades se forman por este proceso de osificación.

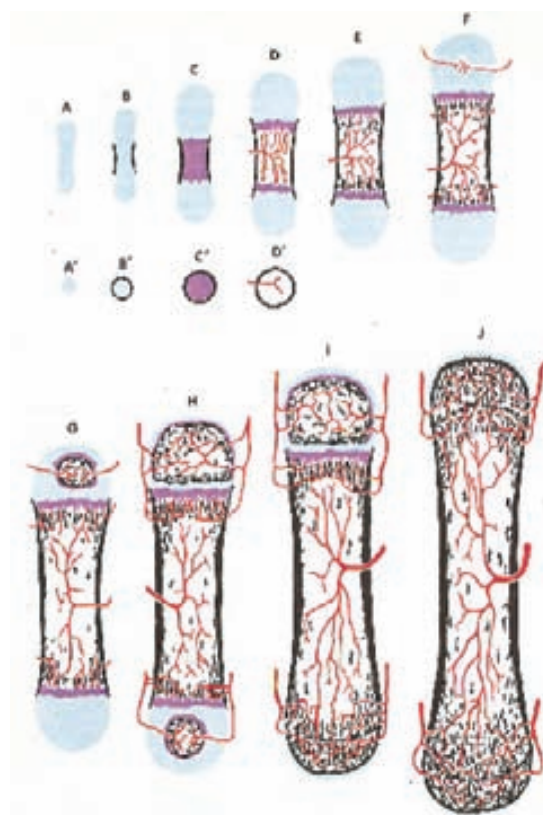


Fig. 6. Diagrama del desarrollo de un hueso largo típico, cortes longitudinales (A-J) y cortes transversales (A'-D'). Azul pálido: cartilago, púrpura: cartilago calcificado, negro: hueso, rojo: arterias. A: modelo cartilaginoso o tallo. B: collar óseo perióstico anterior a la calcificación del cartilago. C: calcificación del cartilago. D: los vasos sanguíneos penetran en la matriz del cartilago calcificado y la dividen en dos zonas de osificación (E). F: los vasos sanguíneos entran en el cartilago epifisario superior y desarrollan un centro de osificación epifisario (G). H: desarrollo de un centro de osificación en el cartilago epifisario superior. A medida que el hueso crece en longitud desaparece primero la placa epifisaria inferior (I) y después la superior (J). Entonces la cavidad medular del hueso se hace continua en toda su longitud y se unen los vasos sanguíneos de la diáfisis, y las epifisis.

Aunque los huesos en crecimiento cambian continuamente su organización interna, retienen aproximadamente la misma forma externa desde un momento temprano del desarrollo fetal hasta la vida adulta. La forma externa se mantiene gracias a un continuo remodelado de la superficie, que implica el depósito de hueso en algunas zonas y la reabsorción en otras³⁴.

1.2.2. Mineralización del tejido óseo

La mineralización ósea, que se desarrolla en cuatro etapas, no se produce inmediatamente después de la síntesis de la matriz ósea.

a) Primera etapa: modificación de la matriz

Antes de la aparición de los primeros cristales minerales, se produce un aumento en la concentración extracelular de calcio y fosfato y en la síntesis de fosfoproteínas, glucoproteínas y sialoproteínas^{35,36}. También aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina y de los enzimas relacionados con la hidrólisis del fosfato orgánico, pirofosfato y nucleósido trifosfato y el transporte de fosfato.

b) Segunda etapa: nucleación

Se produce un cambio de estado de las diferentes formas de fosfato cálcico presentes en la matriz, controlado, entre otros factores, por el componente mayoritario de la fase orgánica, el colágeno de tipo I. Se forman varios intermediarios de la hidroxiapatita, como el trifosfato de calcio amorfo y el fosfato de octacalcio, que posteriormente se ensamblan jerárquicamente dando lugar a hidroxiapatita^{14,37}.

c) Tercera etapa: crecimiento

La concentración local de calcio y fosfato disminuye en esta etapa. Una vez formados los primeros cristales de hidroxiapatita o de otros fosfatos de calcio, se forman cristales adicionales de hidroxiapatita en la superficie de los primeros

cristales formados. La orientación de estos cristales queda determinada por la organización de la matriz de colágeno¹⁴.

d) Cuarta etapa: remodelación

La actividad de los osteoclastos permite la remodelación del hueso y el mantenimiento de su estructura. Este proceso está controlado por: hormonas reguladoras del calcio, como la hormona paratiroidea y la 1,25-di-hidroxi-vitamina D, hormonas sistémicas, como la tiroxina, la insulina y los glucocorticoides, factores de crecimiento, como el epidérmico y el derivado de plaquetas y factores locales producidos por las células del tejido óseo, como las prostaglandinas³⁷.

1.2.3. Reparación del tejido óseo

Después de una fractura se produce una hemorragia local por lesión de los vasos sanguíneos, destrucción de la matriz y muerte de las células óseas. El coágulo formado por la hemorragia se organiza mediante tejido conjuntivo que se vuelve más denso. Este tejido conjuntivo da lugar a cartílago y fibrocartílago que constituyen el callo fibrocartilaginoso que llena la fisura entre los extremos de la fractura¹⁷. La formación del hueso, que terminará por unir los extremos de la fractura, comienza al activarse las células osteoprogenitoras del periostio y el endostio³¹. Estas células depositan matriz ósea que forma una red de trabéculas (callo óseo) alrededor del callo cartilaginoso. Como ocurre en la formación endocondral del tejido óseo, la osificación del callo cartilaginoso se realiza mediante su sustitución gradual por hueso. Posteriormente, las formaciones de hueso esponjoso de los dos fragmentos se unen y se produce una reorganización y reconstrucción interna que dan lugar a hueso compacto.

En ciertos lugares, donde el tejido conjuntivo carece de capacidad osteogénica, la reparación de las fracturas tiene lugar sin formación de callo fibrocartilaginoso²⁷. Si hay buena aproximación de los fragmentos de la fractura, el hueso se une sin necesidad

del callo. Si la aproximación es deficiente o no existe, la reparación puede tener lugar solamente en forma de unión fibrosa relativamente débil.

1.3. Tratamientos utilizados en las lesiones del tejido óseo

Debido a su compleja estructura y a las funciones que realiza, se producen una gran cantidad de lesiones en el tejido óseo². Algunas de estas lesiones se subsanan espontáneamente, mediante el proceso natural de reparación del tejido óseo, mientras que otras necesitan tratamientos más o menos complejos.

Algunas fracturas que no se curan espontáneamente, especialmente aquellas relacionadas con la clavícula, escápula, húmero, muñeca, mano y pie, se pueden tratar sin cirugías, utilizando métodos de fijación externa. En los casos en que este tipo de tratamiento no es suficiente, se recurre a la fijación interna utilizando clavos, alambres, clavijas y placas de osteo-síntesis para estabilizar el hueso³⁸.

Entre un 5 - 10% de las fracturas necesitan un tratamiento posterior, debido a la interposición de tejidos blandos, fijación incorrecta de la fractura, pérdida de masa ósea, suministro de sangre dañado e infección. En otros casos hay que eliminar un gran volumen de tejido óseo a causa de tumores, osteomielitis, etc⁷ que debe ser reemplazado por un implante o sustituto de hueso.

1.3.1. Injertos de hueso

La reconstrucción de grandes defectos óseos y el tratamiento en casos de escasa regeneración tisular requieren el uso de injertos³⁹. El material óptimo para el injerto es el propio tejido óseo del paciente (transplante autólogo), obtenido por ejemplo de la cresta ilíaca. Este tipo de injertos se caracterizan por ser⁴⁰:

- a) Osteoconductivos: proporcionan un material donde las células óseas pueden proliferar.

- b) Osteoinductivos: inducen a las células progenitoras a proliferar y a diferenciarse a osteoblastos.
- c) Osteogénicos: son un reservorio de células progenitoras que pueden formar tejido óseo nuevo.

Esta estrategia presenta varios aspectos negativos ya que se produce dolor al obtener el tejido óseo de la cresta ilíaca, hay riesgo de infección, la mayor parte del componente celular (osteogénico) no sobrevive al trasplante y tiene las limitaciones, inherentes al tratamiento, en pacientes muy jóvenes o de edad avanzada⁴¹. Además, durante la obtención del hueso se producen complicaciones en un 8 - 20% de los casos incluyendo formación de hematomas, pérdida de sangre, lesiones en nervios y arterias y formación de hernias y fracturas⁴².

Los injertos óseos de donantes humanos o alogénicos y los de origen animal o xenogénicos (por ejemplo de hueso bovino) procesados se usan cuando el trasplante autólogo es imposible. Las propiedades de estos dos tipos de injertos son parecidas a las del propio hueso en lo que a estabilidad mecánica y elasticidad se refiere, aunque la falta de capacidad osteogénica, la inmunoreactividad y la posible transmisión de patógenos son una limitación, incluso cuando los factores osteoinductivos se han preservado durante el procesado⁴³.

1.3.2. Sustitutos de hueso

La alternativa a los injertos de hueso es la utilización de materiales naturales o sintéticos capaces de reproducir las características del tejido autólogo. Estos materiales deben ser osteoconductivos, osteoinductivos, biocompatibles, de estructura similar a la del hueso, de fácil manejo, biodegradables y de una producción asequible. Actualmente se utiliza una gran variedad de materiales en la reconstrucción de defectos óseos. Los más utilizados hasta el momento se comentan a continuación y sus principales características se especifican en la tabla 2.

1.3.2.1. Materiales osteoconductivos

El **sulfato de calcio** (CaSO_4) ha sido ampliamente utilizado en su forma hidratada, al mezclarse con agua, inicia una reacción exotérmica que lleva a la recristalización del sulfato de calcio en forma sólida. El mayor inconveniente de este proceso, es la formación de cristales de tamaños y formas no controlables, lo que produce una gran variabilidad en sus características de solubilidad, porosidad y propiedades mecánicas. La producción controlada de sulfato de calcio cristalino ha permitido su uso en la clínica⁴⁴. Un ejemplo es Osteoset[®] (AMT Aromando) un material en forma de gránulos o polvo, que se disuelve *in vivo* en 4-8 semanas.

Los **materiales cerámicos**, basados en fosfatos y carbonatos de calcio, han sido ampliamente utilizados y comercializados debido a su semejanza química y estructural con la matriz ósea y a su biocompatibilidad. El fosfato de calcio más utilizado es la hidroxiapatita (Fig. 7), tanto para recubrir implantes como para llenar defectos⁴⁵.

A partir del coral se han desarrollado también diversos materiales para la regeneración ósea⁴⁶, ya que poseen una estructura, formada por carbonato de calcio, similar a la estructura del tejido óseo. A continuación se comentan materiales derivados de coral más utilizados:

- a) Corales naturales: usados directamente en la forma de carbonato de calcio.
- b) Corales tratados con detergentes para eliminar la fase orgánica y esterilizados posteriormente: se han utilizado en forma de gránulos y bloques.
- c) Corales sometidos a procesos químicos para transformarlos en fosfatos de calcio y obtener hidroxiapatita. Estos procesos, basados en reacciones de intercambio hidrotérmico en estado sólido, preservan la porosidad interconectada del coral.
- d) Híbridos de fosfato de calcio (hidroxiapatita) y carbonato de calcio. El proceso consiste en depositar una capa, de grosor controlable, de fosfato de calcio

sobre una estructura de carbonato de calcio. Con estos híbridos se han obtenido resultados satisfactorios en la reconstrucción de hueso esponjoso⁴⁵.

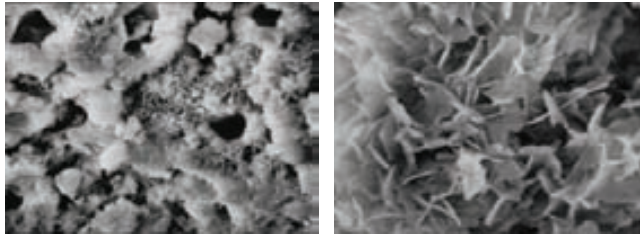


Fig. 7. Imágenes de variantes morfológicas de hidroxiapatita obtenidas mediante microscopía electrónica.

El trifosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) es un material cerámico bioabsorbible y biocompatible. Sin embargo, por su inadecuada porosidad y su rápida disolución (6 semanas) no es buen candidato como sustituto de hueso. Para paliar estas deficiencias, se han desarrollado variantes como el β -trifosfato de calcio, que tiene un rango de porosidad interconectada que oscila entre $1\mu\text{m}$ y 1mm y una estructura similar a la del hueso esponjoso^{47,48}.

El **colágeno** (Fig. 8), uno de los componentes mayoritarios de la matriz ósea, ha sido ampliamente utilizado en la regeneración del tejido óseo. El colágeno está implicado en la deposición mineral, el crecimiento de vasos y la unión de factores de crecimiento⁴⁹.

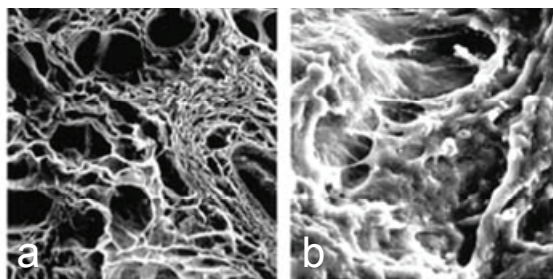


Fig. 8. Imágenes de soportes de colágeno obtenidas mediante microscopía electrónica. Soporte de colágeno sin (a) y con células endoteliales humanas (b).

Como aspectos negativos del colágeno destacan una potencial respuesta inmune y la necesidad de un soporte estructural adicional a dicho material. A pesar de esto, se han obtenido buenos resultados al utilizar materiales compuestos por fibras de colágeno y fosfato de calcio poroso (formado por diferentes proporciones de hidroxiapatita y trifosfato de calcio) en relación 1:1⁵⁰.

Tipo	Injerto	Osteo- conducción	Osteo- inducción	Osteo- génesis	Ventajas
Hueso	Antólogo	3	2	2	“Mejor opción”
	Alogénico	3	1	0	Gran disponibilidad
Derivados del tejido óseo	MOD	1	2	0	Mantiene BMPs
	Colágeno	2	0	0	Buen vehículo para liberar moléculas
Materiales cerámicos	TFC	1	0	0	Biocompatible
	Hidroxiapatita	1	0	0	Biocompatible
Injertos compuestos	TFC/AMO	3	2	2	Gran disponibilidad

Tabla 2. Materiales utilizados como sustitutos de hueso. Puntuación: 0 (nada) a 3 (excelente). MOD: matriz ósea desmineralizada, BMPs: proteínas morfogenéticas del hueso, TFC: trifosfato de calcio, AMO: aspirado de médula ósea.

1.3.2.2. Agentes osteoinductivos

La **matriz ósea desmineralizada**, preparada a partir de hueso alogénico o xenogénico, es un material osteoinductivo que induce la proliferación de las células progenitoras y su diferenciación a células del tejido óseo⁵¹. Este material, se obtiene al tratar hueso compacto con HCl diluido que elimina la fase inorgánica de la matriz ósea y mantiene el colágeno tipo I, las proteínas no colágenas y los factores de crecimiento

del tejido óseo⁵². La matriz ósea desmineralizada se utiliza habitualmente en combinación con otros materiales como la hidroxiapatita y el tejido óseo humano para mejorar sus propiedades mecánicas.

La combinación de biomateriales y **factores de crecimiento** está empezando a ser utilizada en pacientes. Clínicamente se utiliza el plasma rico en plaquetas, que contiene además del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) diferentes factores dependiendo del procesado⁵³. También se ha utilizado la proteína BMP-2 que pertenece a una familia de proteínas (BMPs) descritas como un factor osteoinductivo relevante en la matriz ósea desmineralizada, en combinación con diversos materiales⁵⁴.

Aunque se están utilizando diferentes tipos de materiales, el injerto autólogo, cuya gran limitación es la cantidad de tejido disponible, es todavía insustituible. Las futuras terapias de regeneración ósea requieren el desarrollo de nuevos materiales combinados con células y factores capaces de estimular la regeneración del tejido óseo.

2. Ingeniería de tejidos

La necesidad de encontrar nuevas terapias para mejorar el funcionamiento de los tejidos lesionados ha hecho emerger un campo multidisciplinar de investigación. Este nuevo campo que requiere la integración de conocimientos de biología celular, ciencia de los materiales, ingeniería, física y matemáticas, pretende diseñar y construir en el laboratorio tejidos funcionales que puedan ser usados para el mantenimiento, regeneración y reemplazo de tejidos dañados⁴³.

Entre las estrategias existentes para desarrollar tejidos funcionales destacan las siguientes:

- a) Transplante celular. El objetivo es aislar un tipo celular concreto e implantarlo con el fin de reemplazar las células cuya función ha cesado. Los principales inconvenientes son el fallo de las células para mantener sus funciones en el huésped y el rechazo inmunológico que puedan producir.
- b) Utilización de sustancias inductoras. Esta estrategia se basa en el aislamiento de moléculas que puedan ser inoculadas o incorporadas en materiales con el propósito de estimular la regeneración del tejido. El éxito depende de la disponibilidad y producción de las moléculas señalizadoras apropiadas (por ejemplo determinados factores de crecimiento) y de la existencia de métodos para la administración de estas moléculas a sus dianas.
- c) Crecimiento de células en biomateriales. Cualquier tipo de tejido está formado básicamente por células y matriz extracelular. La matriz actúa en los tejidos como un soporte biológico tridimensional para las células, proporcionándoles un ambiente específico⁵⁵. La finalidad de esta estrategia es implantar un biomaterial de una estructura similar a la del tejido a regenerar, sembrado con un tipo celular que pueda dar lugar a las células del tejido dañado (Fig. 9). El posible rechazo inmunológico puede ser evitado mediante medicamentos o

utilizando células del propio paciente. Los soportes pueden ser materiales naturales como el colágeno o polímeros sintéticos³.

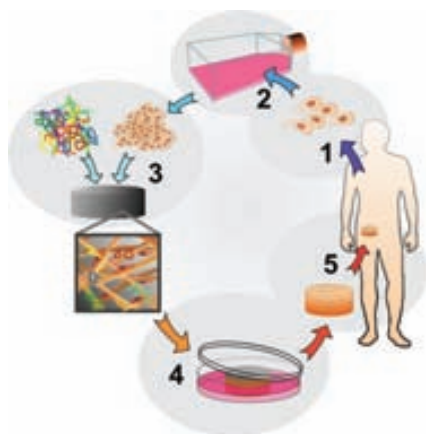


Fig. 9. Esquema de la estrategia de desarrollo de un tejido funcional basada en el crecimiento de células sobre biomateriales. Las células aisladas del paciente se expanden *in vitro* y se siembran sobre el material de elección, posteriormente se implanta el material sembrado en la lesión a tratar.

La tercera estrategia es probablemente la más adecuada para la regeneración del tejido óseo. Para su óptima aplicación es necesaria la selección previa de un tipo celular y un biomaterial capaces de estimular esta regeneración. En los siguientes apartados se exponen los tipos celulares y los biomateriales más utilizados hasta el momento y los más prometedores en la ingeniería del tejido óseo.

2.1. Tipos celulares

Se ha utilizado una gran variedad de células en la ingeniería de tejidos. Los primeros trabajos se realizaron con células maduras aisladas de tejido adulto. Estas células tienen la ventaja de evitar problemas inmunológicos al ser células autólogas, pero tienen una tasa de crecimiento baja y un alto grado de senescencia. Se han empleado también células fetales ya comprometidas a mesodermo, endodermo o ectodermo,

que han demostrado una mayor capacidad proliferativa y menor senescencia que las células adultas⁵⁶.

Posteriormente empezaron a utilizarse células troncales (*stem cells*), caracterizadas por auto-renovarse, diferenciarse a múltiples linajes y tener la capacidad de reconstruir tejidos *in vivo*. Las células troncales se clasifican en dos grupos, las células troncales embrionarias (CTEs), que forman una población celular capaz de dar lugar a la mayoría de tipos celulares y tejidos⁵⁷ y las células troncales adultas (CTAs), que residen en los tejidos adultos y dan lugar a las células diferenciadas específicas de cada tejido. Éstas últimas son las responsables de la capacidad regenerativa de los tejidos y generalmente tienen un rango de diferenciación más limitado que las CTEs.

2.1.1. Células troncales embrionarias (CTEs)

Una vez el oocito ha sido fertilizado, las células resultantes de las dos primeras divisiones son totipotentes y posteriormente constituyen el embrión y la membrana que dará lugar a la placenta.

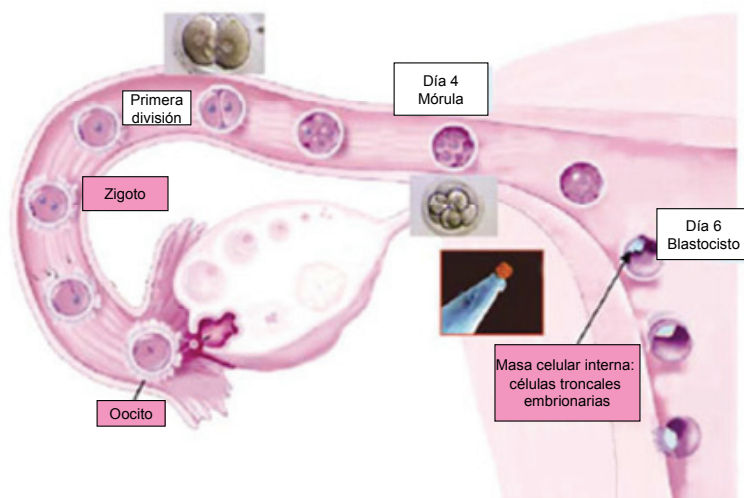


Fig. 10. Diagrama que muestra el desarrollo y la implantación de un embrión humano durante primeras etapas posteriores a la fertilización del oocito. Las CTEs se obtienen de la masa celular interna del blastocisto.

El cuarto día se forma la mórula (Fig. 10) y el sexto día las células que integraban la mórula se compactan formando la masa celular interna (blastocisto) que dará lugar al embrión. De esta masa celular se derivan las CTEs.

Para la obtención de las CTEs, la masa celular interna aislada del blastocisto se disgrega y se siembra en una placa cubierta normalmente de fibroblastos de ratón inactivados (*feeder layer*) en la que se forman colonias (Fig. 11) que contienen tipos celulares del mesodermo, endodermo y ectodermo distribuidos aleatoriamente⁵⁸. El cocultivo de estas células con células maduras o tejidos, induce la diferenciación de las células embrionarias.

Las CTEs se mantienen en estado indiferenciado mientras se cultiven en determinadas condiciones de confluencia, si se permite la formación de conglomerados, las células se diferencian espontáneamente. A partir de CTEs se han derivado células secretoras de insulina, cardiomiocitos, células hematopoyéticas, células endoteliales, osteoblastos, hepatocitos y tejido neuronal⁵⁹.

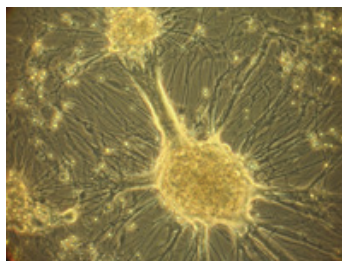


Fig. 11. Agregado de CTEs de ratón sobre una capa de fibroblastos.

Existen algunas limitaciones importantes para el uso terapéutico de estas células:

- a) Las poblaciones de CTEs no son homogéneas y se requieren estrategias de selección para obtener poblaciones con un potencial de diferenciación específico.
- b) Cuando se utilizan células obtenidas de individuos diferentes al paciente, pueden dar lugar a una respuesta inmunológica. Recientemente se ha

propuesto un procedimiento para evitar este problema basado en la utilización de técnicas de transferencia nuclear somática. De esta forma se podrían generar embriones autólogos de los que aislar la masa celular interna y así obtener CTEs autólogas.

- c) El cultivo prolongado de estas células conlleva cambios genéticos y epigenéticos⁶⁰ que podrían potenciar su capacidad de producir tumores.
- d) Restricciones legales y éticas.

2.1.2. Células troncales adultas (CTAs)

Las células maduras de cada tejido provienen de un conjunto de CTAs residentes en la mayoría de órganos y tejidos del organismo. Se observó, que después de transplantes de médula ósea, en los que el sexo del donante y del receptor eran diferentes, las células del donante se podían encontrar en múltiples órganos del receptor, adoptando el fenotipo de las células del tejido donde se encontraban⁶¹. Esto sugirió la existencia de células troncales migratorias del donante que anidarían en los tejidos del huésped.

Muchos tejidos adultos contienen células troncales que tienen la capacidad de dividirse tras lesiones, enfermedades o debido al envejecimiento, cuya función es la regeneración del tejido. Estas células pueden encontrarse también en otros tejidos que sirven como reservorios, por ejemplo, aunque la médula ósea es la mayor fuente de células troncales hematopoyéticas, los precursores hematopoyéticos pueden encontrarse también en otros tejidos⁶².

2.1.2.1. Células mesenquimales (MSCs)

En la médula ósea existe una población heterogénea de células no hematopoyéticas que constituyen el estroma de la médula ósea. Éste está integrado por células

mesenquimales, células del tejido conectivo, componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento⁶³.

En 1970 se demostró *in vitro* la existencia, entre las células del estroma, de precursores que formaban colonias con una elevada heterogeneidad morfológica, de tamaño y capacidad proliferativa⁶⁴. Esta heterogeneidad condujo a la hipótesis de la existencia, de una organización jerárquica en el estroma, controlada por un tipo celular pluripotente (capaz de diferenciarse a tejidos de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico^{62,65-67} (Fig. 12)) y con capacidad de auto-renovación, que se denominó *bone marrow stromal stem cell* o *mesenchymal stem cell* (MSC) (Fig. 13).

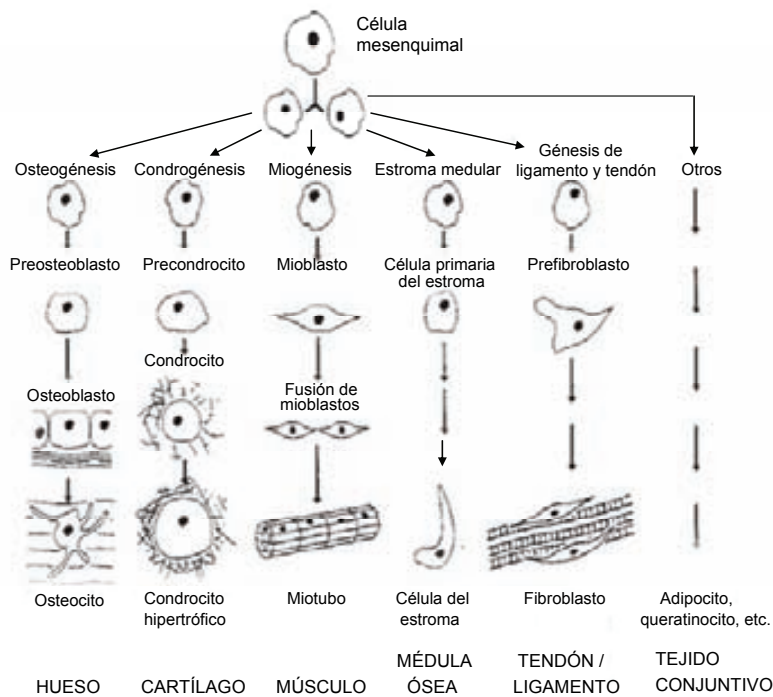


Fig. 12. Esquema de las vías de diferenciación más comunes que pueden seguir las MSCs.

Las MSCs se caracterizan⁶⁸ por la ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, CD11 y las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, CD40, CD31 (PECAM-1), CD18 (LFA-1) y CD56 (molécula de adhesión neuronal-1). Y

aunque se han identificado un gran número de marcadores de superficie (CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD71, Stro-1) y de moléculas de adhesión (CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM), ICAM-1, CD29) que las MSCs pueden expresar, no existe una caracterización fenotípica bien conservada de una población pura de estas células. La expresión de moléculas de superficie en las MSCs varía según la especie de la cual son aisladas, por ejemplo, mientras las MSCs de rata y humanas son negativas para CD34, se ha descrito una expresión variable de este antígeno en las MSCs murinas.

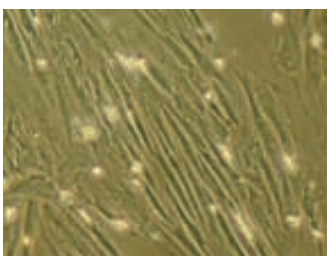


Fig. 13. Imagen de MSCs aisladas de médula ósea humana en cultivo.

Se ha descrito que las MSCs confieren tolerancia al sistema inmune. Según algunos estudios⁶⁹ las MSCs, no sólo son capaces de evadir el sistema inmune, sino que además pueden suprimir la respuesta inmune dirigida a un tercer tipo celular. Se ha demostrado^{69,70} también que estas células inhiben la activación de las células T *ex vivo*.

El potencial de diferenciación de las MSCs las hace buenas candidatas para el uso clínico en la regeneración de tejidos, en particular para la reparación de hueso, cartílago, tendón y músculo esquelético. Sin embargo, la obtención de MSCs de médula ósea, conlleva sufrimiento para el paciente y es de bajo rendimiento. La baja concentración de MSCs en la médula ósea^{62,65,66} (1 de cada 10^5 células) implica un proceso posterior de expansión *in vitro* que puede alterar las características de estas células. Estos inconvenientes han motivado el interés por aislar MSCs de otros tejidos.

El tejido adiposo contiene células de fenotipo mesenquimal, capaces de diferenciarse a células adiposas, condriogénicas, miogénicas, osteogénicas y neuronales^{71,72}, representando así una alternativa para al aislamiento de MSCs de la médula ósea. Las MSCs de tejido adiposo comparten la mayoría de los marcadores de superficie que caracterizan a las MSCs de médula ósea y su morfología. Estas células se aíslan siguiendo el mismo protocolo partiendo, en este caso, de un lipoaspirado⁷³, cuya obtención sólo requiere la aplicación de anestesia local al paciente y tiene un rendimiento 2-4·10⁵ células/mm³ de lipoaspirado.

También se han aislado células multipotentes de la dermis de humanos y ratones. Estas células son capaces de diferenciarse *in vitro* mediante estímulos específicos a neuronas, glía, músculo liso, adipocitos y a células hematopoyéticas *in vitro* e *in vivo*⁷⁴ y mantienen su multipotencialidad durante tiempos de cultivo largos. Las células multipotentes de la dermis difieren de las MSCs de médula ósea en su morfología (ya que generan esferas flotantes similares a las neuroesferas) y en su rápida capacidad de inducción a la producción de proteínas neuronales.

2.1.2.2. Células progenitoras multipotentes adultas (MAPCs)

Estas células progenitoras son un tipo de CTAs derivadas de tejidos como la médula ósea, el músculo y el cerebro⁷⁵. Son multipotentes, es decir, una sola célula inyectada en un blastocisto puede contribuir a todos los tejidos del embrión, incluyendo músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, pulmón, intestino, sistema nervioso central, piel, bazo y sangre. Las MAPCs son capaces de diferenciarse *in vitro* en varios tejidos de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico.

Los clones de MAPCs son capaces de proliferar *in vitro* más de 120 divisiones celulares sin aparente envejecimiento ya que manifiestan niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. Se ha descrito que estas células no expresan CD34, CD44, MHC I, MHC II y CD45, mientras que expresan entre otros Oct4, un factor de

transcripción requerido para el mantenimiento del estado de indiferenciación en las CTEs, a un nivel similar al de éstas⁷⁶.

2.1.2.3. Células de cordón umbilical

En las últimas décadas, la sangre de cordón umbilical ha sido explorada como una fuente, alternativa a la médula ósea, de células para trasplantes y terapia celular, debido a sus componentes hematopoyéticos y no hematopoyéticos (mesenquimales). Contrariamente al proceso de aislamiento de la médula ósea, la sangre de cordón umbilical se obtiene durante el nacimiento mediante un proceso simple, seguro e indoloro. Desde finales de los años 80, se ha utilizado la sangre de cordón umbilical en trasplantes de células troncales hematopoyéticas para tratar algunos desórdenes hematológicos⁷⁷.

Sin embargo existe controversia, posiblemente resultante de diferencias metodológicas, en relación a la presencia de MSCs en el cordón umbilical, mientras algunos grupos han aislado MSCs de sangre de cordón que han podido expandir y caracterizar *in vitro*, otros grupos dudan de su existencia^{71,78,79}.

2.1.3. Células troncales cancerosas

Recientemente se ha especulado sobre la existencia de una relación entre las células troncales y las células tumorales.

La observación en los tumores de células que poseen las características de células troncales⁸⁰, tales como la capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares⁸¹, ha llevado a la hipótesis de la existencia de células troncales tumorales responsables del mantenimiento de los tumores.

También se ha sugerido recientemente que el cultivo *in vitro* y la implantación ectópica de las células troncales puede inducir defectos genéticos y epigenéticos que pueden conducir a su transformación (Fig. 14), dando lugar a algunas de las poblaciones

celulares observadas en muchos tumores⁸¹. Además se conoce que la implantación de CTEs en animales de experimentación o en pacientes puede dar lugar a teratomas^{82,83}.

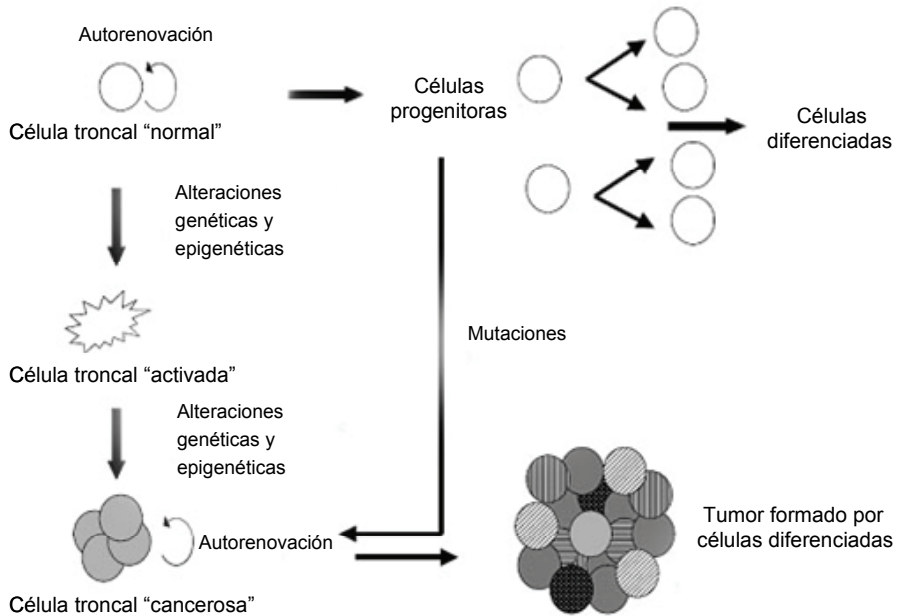


Fig.14. Modelo del desarrollo de células cancerosas a partir de células troncales y células progenitoras.

En particular, diversos grupos han observado que la expansión *in vitro* y la implantación, en animales inmunocomprometidos, de MSCs aisladas de médula ósea murina da lugar a sarcomas^{84,85}. Sin embargo, a pesar de la existencia de varios estudios, no se ha descrito la formación de tumores por inoculación de MSCs humanas^{86,87}.

2.2. Biomateriales

Los materiales candidatos a ser utilizados en la ingeniería de tejidos tienen la doble función de dirigir la morfogénesis *in vivo* y servir de soporte para la estructura y función del implante durante su integración en los tejidos del huésped.

El material o soporte ideal para la regeneración tisular debe tener una serie de propiedades⁶¹:

- a) Estar compuesto por un material biocompatible, es decir, que no sea citotóxico.
- b) Actuar como soporte para el crecimiento del tejido en tres dimensiones.
- c) Poseer una red de poros interconectados con un diámetro que exceda de los 100 μm y permita de este modo la penetración de las células, la formación de tejido nuevo y su vascularización.
- d) Integrarse al tejido huésped sin la formación de cicatriz.
- e) Tener una textura superficial y composición química que promuevan la adhesión celular y la adsorción de moléculas biológicas como los factores de crecimiento.
- f) Eliminarse a la vez que se repara el tejido dañado, generando productos de degradación no tóxicos que puedan ser fácilmente excretados.
- g) Poderse producir en formas que se ajusten a las del defecto a tratar.
- h) Tener propiedades mecánicas adaptadas a las necesidades del tejido a regenerar.
- i) Poderse producir comercialmente bajo las regulaciones existentes y con un coste que permita su uso rutinario en clínica.
- j) No alterar el potencial clonogénico y proliferativo de las células troncales que se siembren en el material.

2.2.1. Materiales para la reparación del tejido óseo

Un gran número de materiales con estructuras moleculares y superficies controladas están siendo desarrollados para la reconstrucción del tejido óseo. La estrategia general consiste en usar materiales que copian las características biológicas de las

matrices extracelulares y así controlar el ambiente de las células troncales que se sembrarán en el biomaterial⁸⁸.

Las investigaciones de un gran número de grupos han dado como resultado una larga lista de materiales con propiedades osteoconductoras. Los avances más recientes incluyen la formación de bloques mediante el ensamblaje de pequeñas moléculas entrelazadoras que permiten generar redes nanofibrilares.

A continuación se describen los tipos de materiales más relevantes en la ingeniería del tejido óseo.

2.2.1.1. Materiales metálicos

El titanio es uno de los metales más utilizados en tratamientos clínicos. Esto es debido a que posee una excelente biocompatibilidad, buena resistencia a la corrosión, gran resistencia mecánica, un espesor reducido y un precio relativamente asequible. La aleación de titanio más empleada en medicina contiene aluminio y vanadio (Ti_6Al_4V) y tiene una gran cantidad de aplicaciones médicas, en prótesis de cadera y rodilla, tornillos óseos, implantes dentales, válvulas cardíacas y marcapasos. El principal defecto de este material es la falta de biodegradabilidad⁸⁹.

In vitro, los soportes fibrilares de titanio permiten la adhesión y la diferenciación de células progenitoras de médula ósea. *In vivo*, se ha observado que este material es osteoconductor sólo cuando se implanta ortotópicamente. La adición de células osteoprogenitoras a los soportes de titanio y el recubrimiento con fosfato de calcio aumentan la formación de tejido óseo en los implantes⁹⁰.

2.2.1.2. Materiales cerámicos

Los materiales cerámicos (capítulo 1.3.2.) han sido los más utilizados hasta el momento para el tratamiento de lesiones óseas. La utilización de cerámicas (materiales basados en fosfatos y carbonatos de calcio) para la reconstrucción ósea se

basa en su semejanza estructural con la fase mineral del hueso. Estos materiales tienen una alta fragilidad, no obstante, poseen algunas propiedades físicas iguales o mejores que las de las aleaciones metálicas como por ejemplo resistencia al calor, a la corrosión y al desgaste.

Las biocerámicas basadas en sales de calcio han inducido la formación de tejido óseo tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos ortotópicos y ectópicos⁹¹.

Una variedad de material cerámico son los biovidrios, de los que existen diversos tipos como los vidrios de silicio, que a pesar de ser altamente bioactivos tienen una tasa de reabsorción lenta, los vidrios de fosfato, que pueden ajustarse a la composición de la fase mineral del hueso, lo que permite modular la velocidad de degradación en un amplio rango⁹² y los vidrios basados en combinaciones de óxidos de silicio, calcio, sodio y fosfato, que han demostrado la formación de uniones con el tejido óseo debido a que estos materiales desarrollan, en la interfase de unión con el tejido, una capa biológicamente activa de hidroxiapatita carbonatada muy similar química y estructuralmente a la fase mineral del hueso⁹³. Los biovidrios son además osteoinductivos, capacidad atribuida a la liberación de productos disueltos en ellos, que estimulan en las células osteogénicas la sobreexpresión de ciertos genes⁹⁴.

2.2.1.3. Polímeros

Mientras que los biomateriales metálicos y cerámicos son poco degradables en un ambiente biológico y la variabilidad de sus características físico-química es limitada, los polímeros se pueden diseñar con gran flexibilidad pudiéndose variar su estructura y composición según las necesidades⁹⁵. La biodegradabilidad se puede modular mediante diseño molecular, así en algunos polímeros se pueden incluir enlaces químicos a medida, susceptibles de hidrólisis en medio acuoso o mediante enzimas presentes en el entorno celular.

Dentro de los polímeros biodegradables utilizados en aplicaciones biomédicas (Fig. 15) podemos distinguir los polímeros naturales y los sintéticos. A continuación se

detallan los materiales más ampliamente desarrollados dentro de estos dos grupos de polímeros biodegradables.

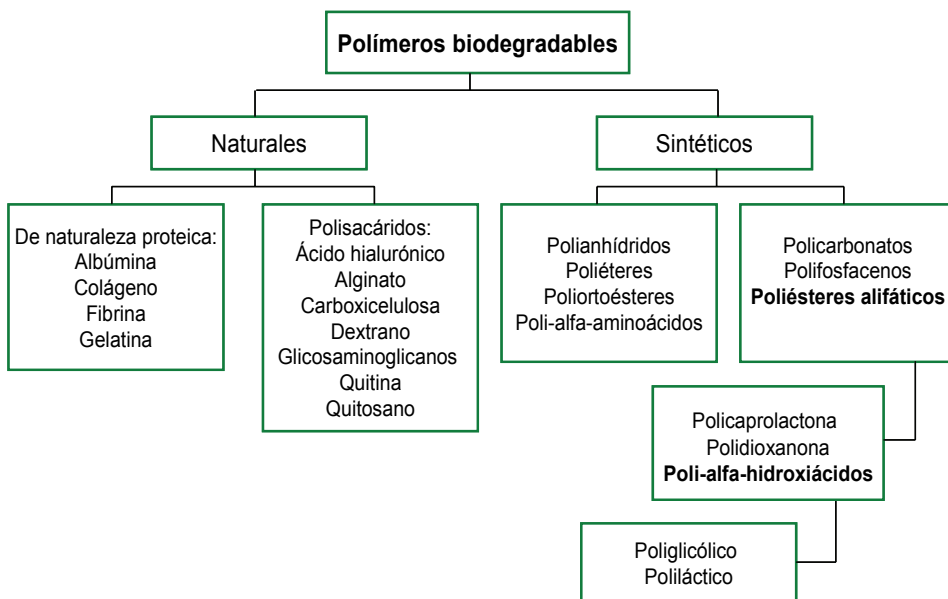


Fig. 15. Clasificación de los polímeros biodegradables de uso más generalizado en aplicaciones biomédicas.

2.2.1.3.1. Polímeros naturales

El uso de polímeros naturales constituye una importante área de investigación, a pesar del gran desarrollo producido durante los últimos años en el campo de los polímeros de origen sintético. Los polímeros de origen natural tienen la ventaja de ser más biocompatibles que los polímeros sintéticos, se obtienen más fácilmente y de forma económica, son fácilmente modificables químicamente, poseen estructuras por las que las células tienen afinidad y son, por lo tanto, un estímulo positivo para la adhesión y el crecimiento celular. Tienen la desventaja de poder ser inmunogénicos y poder transmitir enfermedades, además al ser poco manipulables se tiene un control reducido sobre sus propiedades mecánicas, de biodegradabilidad y de reproducibilidad⁹⁶.

Los polímeros naturales se clasifican dependiendo de que posean una naturaleza proteica o de tipo carbohidrato.

a) Polímeros de naturaleza proteica:

- El colágeno es una proteína fibrosa, formada por la unión de moléculas de tropocolágeno (formado por tres cadenas polipeptídicas), que constituye el principal componente de la matriz extracelular de muchos tejidos. Una vez en el organismo, el colágeno es degradado por las colagenasas y reabsorbido. Debido a sus propiedades mecánicas y su baja estabilidad generalmente se mezcla con otros compuestos (cerámicos por ejemplo) para aplicaciones biomédicas⁹⁷. Ha sido utilizado ampliamente como soporte para el crecimiento celular, aunque sólo el colágeno tipo I y tipo II promueven la diferenciación de células progenitoras a osteoblastos *in vivo*. Se han estudiado los copolímeros de colágeno y otras estructuras como los glucosaminoglucanos y se ha observado que estos copolímeros poseen cualidades convenientes para su aplicación en la ingeniería de tejidos, por ejemplo, pueden ser esterilizados por diversos tratamientos, sus tasas de degradación pueden ser ajustadas y su porosidad controlada⁹⁸.
- La fibrina es una proteína fibrosa formada a partir del fibrinógeno (glucoproteína plasmática formada por 3 pares de polipéptidos) por acción de la trombina (Fig. 16). Las ventajas más importantes de este polímero proteico son la posibilidad de obtener fibrina del propio paciente, evitando así reacciones inflamatorias⁹⁹, y que su degradación es parte de un proceso fisiológico normal llevado a cabo por una proteína presente en sangre, la plasmina. La fibrina se utiliza como reemplazo tisular temporal, ya que puede ser administrada como un precursor líquido de dos componentes que al mezclarse forman un hidrogel en los lugares de aplicación¹⁰⁰.

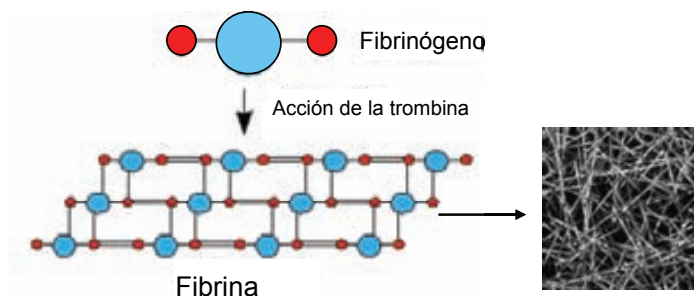


Fig. 16. Formación una red de fibrina mediante el ensamblaje de fibrinógeno e imagen tomada por microscopía electrónica de una red de fibrina.

- La gelatina (Fig. 17) es una forma procesada del colágeno que habitualmente se obtiene de piel de origen porcino mediante una maceración ácida seguida de una extracción de la gelatina (gelatina tipo A) o de piel de origen bovino mediante una maceración básica y una posterior extracción de la gelatina (gelatina tipo B). La gelatina es una proteína fibrosa hidrolizada por las gelatinasas y, como el colágeno, tiene una baja estabilidad, por lo que frecuentemente se utilizan agentes estabilizantes como el glutaraldehído, que sin embargo pueden disminuir su biocompatibilidad¹⁰¹. Este polímero ha sido muy estudiado como agente encapsulante para la fabricación de sistemas de liberación de fármacos, como apósito para heridas y como adhesivo en cirugía.

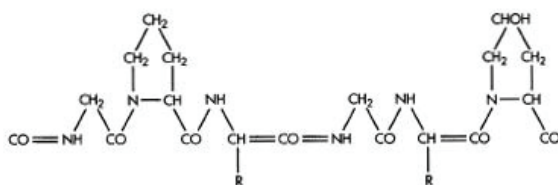


Fig. 17. Estructura química de la gelatina.

En diversos estudios se ha demostrado que los soportes de gelatina tienen potencial para su aplicación en ingeniería de tejidos¹⁰², no obstante, tienen el inconveniente del escaso conocimiento existente sobre las propiedades mecánicas de este material, a pesar de que su capacidad para soportar el

crecimiento y diferenciación de células progenitoras ha sido comprobado por diversos grupos^{103,104}.

b) Polímeros de tipo carbohidrato:

- Los polímeros basados en ácido hialurónico son cadenas de disacáridos N-acetil glucosamina y ácido glucurónico (Fig. 18) y han sido utilizados por diversos grupos para la reconstrucción de los tejidos óseo y cartilaginoso¹⁰⁵. Este ácido, que se encuentra en la matriz extracelular de muchos tejidos, está cargado negativamente y sus propiedades de viscosidad y elasticidad lo hacen un candidato ideal para la distribución de proteínas, fármacos y péptidos¹⁰⁶ *in vivo*, además, el ácido hialurónico es degradado por las hialuronidasas.

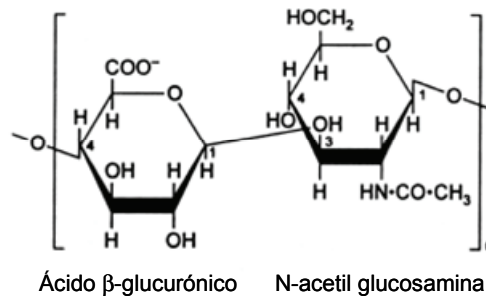


Fig. 18. Estructura química de la unidad repetitiva básica del ácido hialurónico.

El ácido hialurónico se emplea en el tratamiento de la osteoartritis, por ejemplo, mediante la inyección directa de este polisacárido en la rodilla del paciente¹⁰⁷. Debido a su gran biocompatibilidad y a su presencia en la matriz extracelular de los tejidos, ha aumentado la investigación para la aplicación del ácido hialurónico en ingeniería tisular.

- El alginato engloba una familia de copolímeros polianiónicos, derivados de las algas marinas *Phaeophyceae*, formados por dímeros de ácido manurónico (unidos por enlaces β1,4) y dímeros de ácido glucurónico (unidos por enlaces α

1,4) (Fig. 19) en proporciones variables. Estos polisacáridos soportan la proliferación de los condrocitos *in vitro* e *in vivo*¹⁰⁸. Uno de los compuestos derivados de alginato más utilizados es el alginato de sodio, que es soluble en soluciones acuosas y forma geles estables a temperatura ambiente en la presencia de ciertos cationes divalentes (Ca, Ba...) (Fig. 20) a concentraciones no citotóxicas¹⁰⁹.

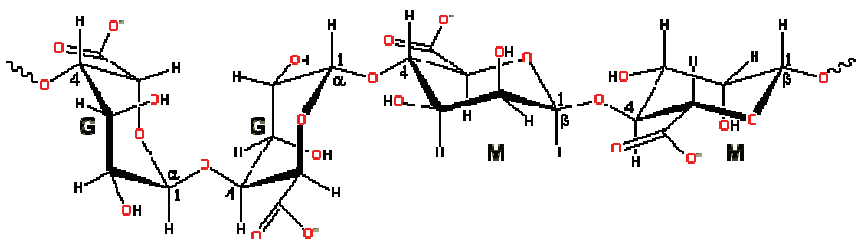


Fig. 19. Estructura química de la unidad básica del alginato, formada por un dímero de ácido glucurónico (G-G) y un dímero de ácido manurónico (M-M).

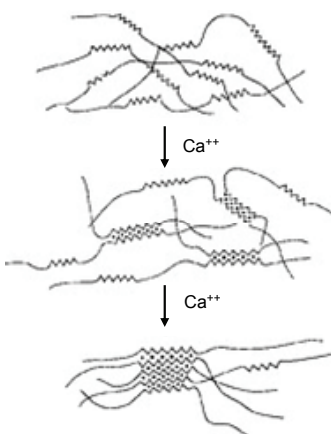


Fig. 20. Ensamblaje de polisacáridos de alginato de sodio y formación de un gel de alginato en presencia de calcio.

La degradación del polímero se produce a medida que se disocian los cationes divalentes. Este material se ha utilizado en una gran variedad de aplicaciones médicas como la encapsulación de células, la estabilización de medicamentos y la implantación de geles de alginato sódico polymerizados con calcio tanto en humanos como en animales para inducir la regeneración tisular¹¹⁰.

- El quitosano es un copolímero lineal (Fig. 21) de N-acetil glucosamina y glucosamina en una proporción del 20% y el 80% respectivamente. Es un polisacárido biocompatible, biofuncional, no tóxico y degradable por las lisozimas¹¹¹. El quitosano se obtiene únicamente a través de la desacetilación de la quitina de caparazones de determinados crustáceos. El grado de pureza con que se obtiene actualmente permite su utilización en aplicaciones biomédicas.

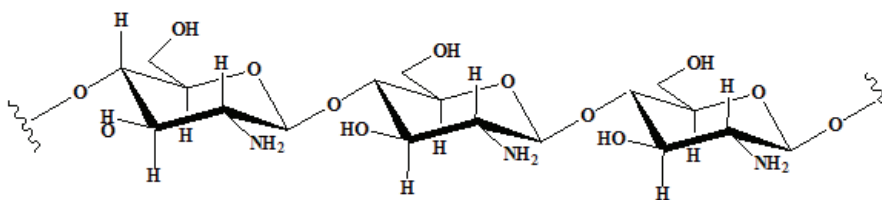


Fig. 21. Estructura química del quitosano.

Este material ha sido evaluado, entre otras aplicaciones, como tratamiento contra el colesterol, como agente hemostático, como vehículo liberador de fármacos, como membrana de hemodiálisis y como coadyuvante en injertos de piel. El quitosano promueve la adhesión, la proliferación e induce la diferenciación de células progenitoras sembradas en el material, además provoca una reacción mínima al ser implantado. Los soportes de quitosano son osteoconductivos y promueven la formación de tejido óseo tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, este material es mecánicamente débil e inestable¹¹², por este motivo se producen materiales híbridos de quitosano y ácido poliláctico, entre otros.

2.2.1.3.2. Polímeros sintéticos

Las ventajas más importantes de estos polímeros son la flexibilidad en el diseño de sus propiedades físico-químicas y mecánicas y la reproducibilidad en su producción⁹⁶.

Los polímeros sintéticos más relevantes por su aplicación biomédica se describen a continuación.

- Dentro del grupo de los poliésteres, los **poli-alfa-hidroxiácidos** que incluyen el ácido poliláctico, el poliglicólico y el copolímero de ambos, son los polímeros sintéticos más usados en ingeniería del tejido óseo. El ácido poliláctico es un polímero semi-cristalino que se sintetiza mediante la polimerización producida por la apertura de anillo del diéster cíclico del ácido láctico (Fig. 22). Este polímero ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones tales como la liberación controlada de fármacos, suturas biodegradables, diferentes implantes para la fijación de suturas y como soporte para el crecimiento de células en la ingeniería de tejidos¹¹³.

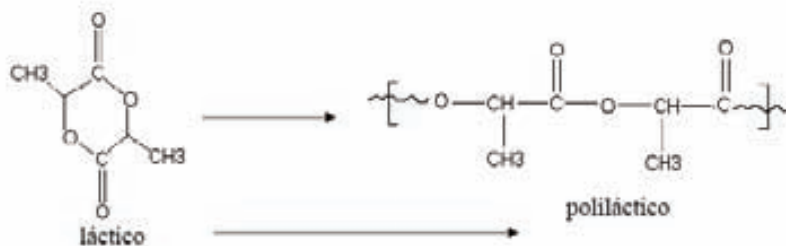


Fig. 22. Síntesis del ácido poliláctico.

El ácido poliglicólico (Fig. 23) es el poliéster alifático lineal más simple y se obtiene mediante la dimerización por apertura del anillo del ácido glicólico. Las fibras obtenidas a partir del ácido poliglicólico se caracterizan por su fuerza y se utilizan como mecanismo de fijación ósea y como suturas.

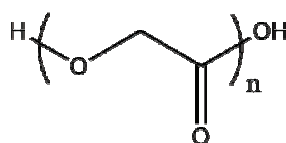


Fig. 23. Estructura del ácido poliglicólico.

Los ácidos poliláctico y poliglicólico se degradan por hidrólisis y los respectivos monómeros liberados se metabolizan a través de la ruta metabólica del ácido cítrico. Los ácidos poliláctico y poliglicólico y el copolímero de ambos se han utilizado como biomateriales en suturas biodegradables en los últimos 40 años. Las matrices de estos poliésteres son biocompatibles, hidrófobas y biodegradables. Se han fabricado micro y nanoesferas de diferentes tamaños de aplicación en la liberación de fármacos¹¹⁴. Recientemente, el cultivo de células sobre soportes de estos poliésteres ha permitido el desarrollo de sustitutos para tejido óseo y cartilaginoso¹¹⁵.

- Los hidrogeles sintéticos están siendo usados para distribuir células y como soportes inyectables en ingeniería de tejidos, un ejemplo son los hidrogeles de polietilenglicol (PEG), el poliéter comercial más importante.

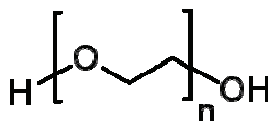


Fig. 24. Estructura del polietilenglicol (PEG).

El PEG (Fig. 24) se produce por la interacción de óxido de etileno con agua, etileno glicol o oligómeros de etileno glicol y se caracteriza por tener un contenido acuoso y propiedades mecánicas similares a las de los tejidos blandos¹¹⁶. Los hidrogeles de PEG son redes hidrófilas de excelente biocompatibilidad, altamente resistentes a la adsorción de proteínas y muy poco inflamatorias, lo que ha permitido su amplia utilización en medicina. Sin embargo, el PEG es un polímero inerte que no permite la adhesión celular, por lo que, recientemente, se han sintetizado hidrogeles de PEG que incorporan moléculas de adhesión celular como el péptido RGD (arginina-glicina-aspartico). Este péptido es una secuencia de unión a las integrinas, derivada

de la fibronectina, que promueve la adhesión celular y la invasión del hidrogel por las células (Fig. 25). La degradación de este hidrogel se puede controlar mediante el uso de péptidos de unión entre los macrómeros de PEG diseñados para que sean sensibles a enzimas secretados por las propias células, como por ejemplo las metaloproteasas (MMPs). Esto hace que el hidrogel sea estable durante meses, y que su degradación tenga lugar progresivamente a medida que el gel es colonizado por las células^{117,118}.

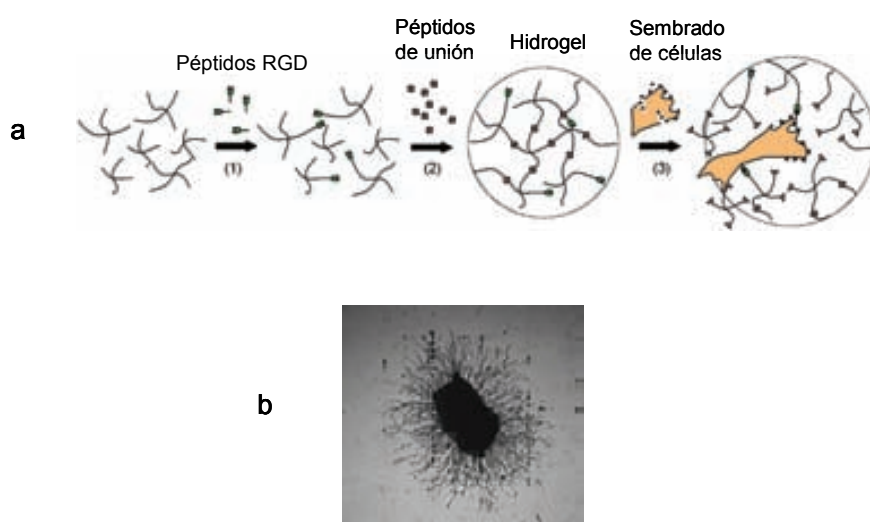


Fig. 25. Hidrogel de PEG-RGD (a) Al añadir al macrómero de PEG los péptidos RGD y de unión se forma una red de macrómeros de PEG que da lugar al hidrogel de PEG-RGD. Al sembrar las células en el hidrogel, éstas se unen al péptido RGD y migran mediante la degradación de los péptidos de unión por la acción de metaloproteasas. Fibroblastos humanos en un soporte de fibrina sembrado en hidrogeles de PEG-RGD (b), se aprecia como los fibroblastos migran del soporte de fibrina e invaden el hidrogel de PEG-RGD adyacente.

2.3. Cultivo *in vitro* del implante

El desarrollo de un implante, compuesto por células sembradas en un material de soporte, implica casi siempre una etapa *in vitro* que permite examinar el material y realizar controles específicos (de proliferación y diferenciación celular) antes de la

implantación. Sin embargo, el cultivo *in vitro* tiene el inconveniente de no poder imitar el ambiente fisiológico ni las cargas mecánicas del tejido natural durante su generación¹¹⁹. Debido a que las fuerzas mecánicas sirven como reguladoras de la función celular e influyen profundamente la arquitectura del tejido en formación y teniendo en cuenta que se busca mimetizar las condiciones de los tejidos *in vivo*, se han diseñado biorreactores especiales para esta etapa *in vitro*. Los biorreactores (Fig. 26) son dispositivos para la realización de procesos biológicos y/o bioquímicos en los que las condiciones de pH, temperatura, presión y concentración de nutrientes están altamente controladas¹²⁰.

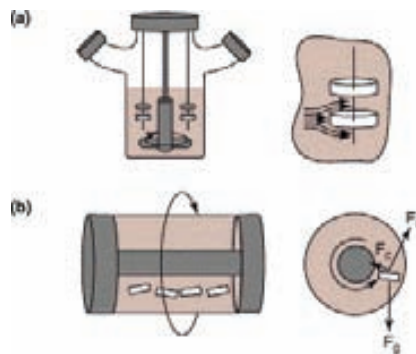


Fig. 26. Biorreactores utilizados para el cultivo celular. a) Durante el sembrado las células son transportadas hacia el soporte y durante el cultivo el movimiento circular permite la mezcla de nutrientes, puede generar turbulencias. b) Este tipo de movimiento proporciona un ambiente dinámico al cultivo con bajas turbulencias y alta homogeneización del medio.

La utilización de biorreactores en la fase *in vitro* de desarrollo de un implante permite controlar el sembrado celular y realizarlo de una forma homogénea. Además, a diferencia de los cultivos estáticos, el medio se mezcla continuamente, manteniéndose así una concentración uniforme de oxígeno y de nutrientes en todo el cultivo.

3. Monitorización del implante

3.1. Monitorización *in vitro*

Con el fin de evaluar el potencial de un biomaterial para ingeniería de tejidos, se realizan habitualmente estudios de sus características físico-químicas y mecánicas^{103,112}, utilizando técnicas de espectroscopia¹¹². Además se estudia la interacción de las células con el material, mediante histología y microscopía electrónica^{91,109,121} y el comportamiento de las células en presencia de medios de crecimiento o de diferenciación, analizando sus características bioquímicas¹⁰³, los genes que se expresan, por ejemplo por RT-PCR^{70,82} y su estado de diferenciación mediante histología e inmunohistoquímica^{103,121, 122}.

Dada la dificultad técnica, la duración y el costo de estos estudios, sólo es posible analizar un número limitado de materiales y tipos celulares a la vez, resultando difícil extrapolar los resultados obtenidos o llegar rápidamente a conclusiones sobre que material y que tipo celular sería el más adecuado para la regeneración de un tejido concreto.

Recientemente se han empezado a utilizar métodos que permiten la síntesis o el análisis de un gran número de materiales al mismo tiempo¹²³, su interacción con diferentes tipos celulares^{124, 125}, su comportamiento en la diferenciación celular y la interacción entre células y pequeñas moléculas adheridas en polímeros biodegradables¹²⁶. Estos procedimientos, llamados de *microarrays* de biomateriales, se basan en la producción de una multitud de variantes de biomateriales, dispuestos sobre soportes, tratados posteriormente con los tipos celulares a estudiar. Esta metodología permite el análisis simultáneo en todos ellos de alguna propiedad de interés, como por ejemplo, la capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación de los diferentes tipos celulares sobre los biomateriales sintetizados^{126,127} (Fig. 27).

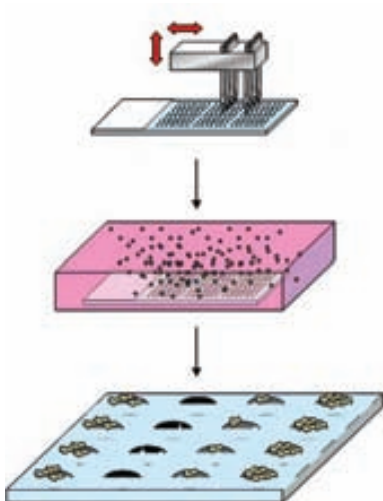


Fig. 27. Esquema de la producción y utilización de un *microarray* de biomateriales. En un primer paso se sintetizan los biomateriales a estudiar y se depositan automáticamente sobre soportes determinados. Posteriormente se siembran las células y se estudian sus características de adhesión, proliferación y diferenciación según el material.

En un estudio de este tipo¹²⁵ se pudo discriminar la diferente capacidad de adhesión y diferenciación de células troncales humanas promovida por 1700 mezclas diferentes de polímeros (Fig. 28, 29).

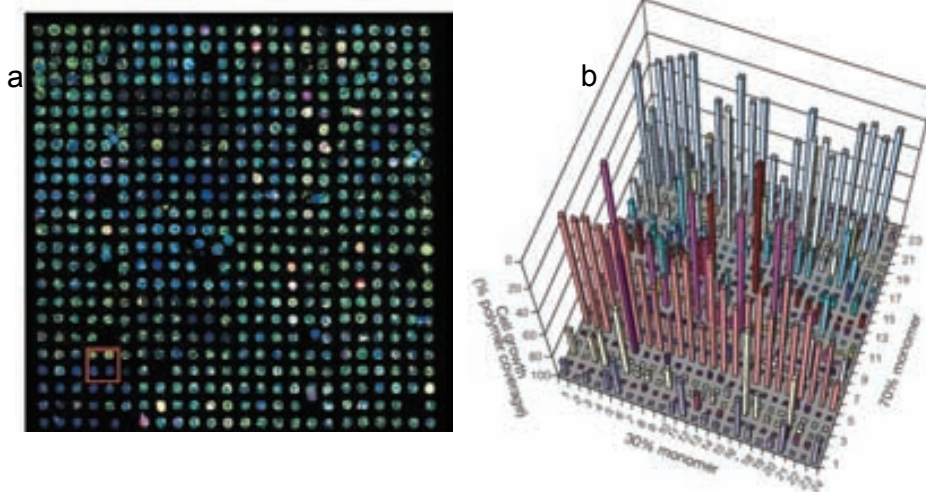


Fig. 28. Detalle de un microarray de biomateriales donde crecen células troncales embrionarias humanas (a) y el análisis del crecimiento de estas células sobre los diferentes polímeros utilizados (b).

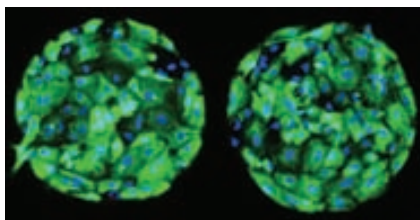


Fig. 29. Detalle de la diferenciación de células troncales embrionarias humanas, sembradas en un microarray de biomateriales, a células epiteliales. La diferenciación se aprecia por la expresión de citoqueratina (verde), los núcleos están teñidos de azul.

3.2. Monitorización *in vivo*, técnicas de imagen

Aunque los ensayos *in vitro* son necesarios y aportan información preliminar sobre la respuesta de las células a determinados materiales, no proporcionan una información real sobre la eficacia de los materiales para promover la proliferación y la diferenciación de dichas células en la regeneración de un determinado tejido *in vivo*. Esto es debido a que *in vitro* no podemos reproducir adecuadamente la complejidad de las interacciones que tienen lugar en los tejidos. Así después de los estudios *in vitro* que permiten preseleccionar materiales y tipos celulares, es necesario realizar estudios *in vivo* que demuestren la utilidad real de las combinaciones de materiales y células preseleccionadas para la regeneración de tejidos.

Las técnicas de imagen que revelan, de forma no invasiva, información acerca de la viabilidad celular en el contexto del organismo vivo, pueden acelerar el desarrollo de nuevos métodos que prolonguen la supervivencia de los injertos y promover así el avance en la regeneración de tejidos¹²⁸. La aparición de este tipo de procedimientos se debe principalmente a los avances en técnicas de biología celular y molecular, al uso de animales transgénicos como modelos, a la disponibilidad de sondas altamente específicas y al fructífero desarrollo de instrumentos para la captación de imágenes en animales de experimentación¹²⁹. Las técnicas de imagen abren la posibilidad de desarrollar métodos no invasivos para visualizar procesos celulares tales como la

proliferación, la expresión génica¹³⁰ y las interacciones entre proteínas. Las técnicas de imagen no invasiva permiten alcanzar estos objetivos rápida, cuantitativa y repetidamente en el mismo animal bajo diferentes condiciones y estímulos, permitiendo una valoración temporal en los animales sin necesidad de sacrificarlos.

Las tecnologías de imagen existentes difieren en cinco aspectos principales: la resolución espacial y temporal, la profundidad de penetración, la energía necesaria para generar las imágenes, la dependencia de sondas inyectables y biocompatibles, y el umbral de detección de las sondas.

En los siguientes apartados se describen las principales técnicas de imagen utilizadas en la ingeniería de tejidos.

3.2.1. Tomografía por emisión de positrones (PET)

La tomografía por emisión de positrones o PET se basa en la detección, controlada en el tiempo, de dos rayos γ emitidos en direcciones diametralmente opuestas como resultado de la reacción de un electrón y un positrón, éste último emitido por un radioisótopo incorporado en la molécula trazadora. La dirección y el cálculo de la diferencia de tiempo de llegada de los dos rayos γ permite generar imágenes tridimensionales de la fuente emisora¹³¹.

La sensibilidad del PET es relativamente alta, en el rango de 10^{-10} - 10^{-12} mols/L, y debido a la gran energía de los rayos γ es independiente de la profundidad a la que se encuentre el trazador marcado¹²⁹. Con esta tecnología se pueden generar imágenes en tres dimensiones con una resolución de 1mm^3 .

Se ha utilizado esta técnica para localizar MSCs, que expresan la timidina kinasa, en ratones¹³² y se está aplicando con éxito con este mismo propósito en otros modelos como el cerdo (Fig. 30).

Una importante limitación de esta técnica es que todos los isótopos que se utilizan resultan en dos rayos γ de la misma energía, por lo que si dos moléculas, cada una

con un isótopo diferente, se inyectan a la vez, no es posible distinguirlos mediante los detectores de PET¹³³. Otros problemas son la dificultad en el desarrollo de nuevos trazadores, el elevado coste del equipo y el espacio necesario para albergarlo.

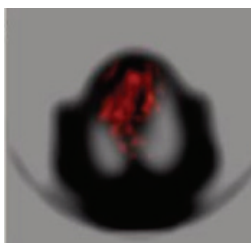


Fig. 30. Imagen de PET de un cerdo, 30 horas después de una inyección intramiocárdica de MSCs porcinas modificadas para la expresión de un reportero de PET (datos no publicados).

3.2.2. Tomografía computerizada (CT)

Esta técnica se basa en la capacidad que tienen los tejidos de absorber de forma diferencial los rayos X. Se utiliza una fuente de rayos X de baja energía y un detector de alta resolución que gira alrededor del cuerpo del animal a la vez que toma imágenes. El posterior procesamiento computerizado de las imágenes permite generar mapas tridimensionales de las estructuras internas.

El CT se ha desarrollado para obtener en poco tiempo imágenes de alta resolución espacial. Así, el rastreo de un ratón entero a una resolución de 100 μm requiere un tiempo de 15 minutos¹³¹. Esta técnica se ha utilizado para monitorizar el crecimiento tumoral y la regeneración ósea¹³⁴ en pequeños animales.

Debido al poco contraste de los tejidos blandos es frecuentemente necesario aplicar un agente de contraste, habitualmente basado en yodo o bario, sin embargo, la irradiación de estos compuestos provoca un efecto ionizante que produce lesiones por liberación de superóxidos y radicales libres. Además, debido a que la sensibilidad y la resolución espacial de la tomografía computerizada dependen del tiempo de exposición y de la cantidad de contraste usado, la posibilidad de tomar imágenes repetidas del mismo animal queda limitada.

3.2.3. Técnicas ópticas de imagen

El fundamento de estos procedimientos es la utilización de los fotones emitidos por un trazador para obtener medidas de parámetros biológicos. Se distinguen dos tipos de fenómenos físico-químicos en los que se basan estas técnicas: la fluorescencia y la luminiscencia.

3.2.4.1. Fluorescencia

La fluorescencia es la emisión de fotones que tiene lugar como consecuencia del regreso al estado basal de energía, de una sustancia (fluoróforo) previamente excitada a un nivel de energía superior mediante la absorción de fotones excitantes (395-600nm, Fig. 31), de mayor energía que los emitidos. El tiempo entre la excitación y la emisión es del orden de milisegundos.

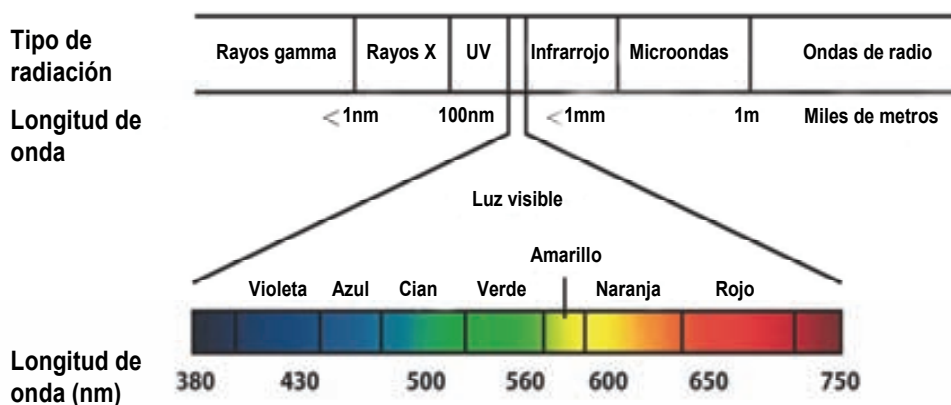


Fig. 31. Representación del espectro electromagnético.

En los casos que nos conciernen, los fluoróforos son generalmente proteínas que se expresan como trazadores en células genéticamente modificadas para ello. La detección de fotones de la correspondiente longitud de onda es evidencia de la presencia del trazador. Un ejemplo bien conocido de fluoróforo es el de la proteína

verde fluorescente (GFP), obtenida de la medusa *Aequorea victoria*. Esta proteína emite luz verde (a 509nm) cuando es excitada con luz violeta (395nm)¹³⁵. Destaca la variante de la proteína verde fluorescente EGFP, que tiene un desplazamiento del espectro de excitación hacia longitudes de onda más largas y su intensidad es 35 veces superior a la de la GFP nativa¹²⁹. También se ha utilizado la proteína roja fluorescente (DsRed) en la cuantificación no invasiva del crecimiento de tumores y metástasis¹³⁶ (Fig. 32).

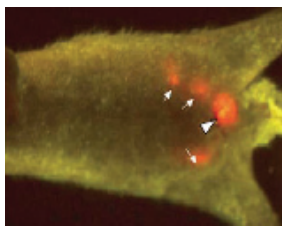


Fig. 32. Imagen ventral de fluorescencia de zona del abdomen y las extremidades, a las dos semanas de haber implantado en la próstata un tumor primario de células PC3 que expresan DsRed, las flechas indican las metástasis.

Los trazadores fluorescentes tienen ventajas importantes en algunos estudios ya que no precisan de la adición de un sustrato para generar fotones. Sin embargo, tienen también desventajas:

- a) La luz excitante debe llegar, a través de los tejidos que son generalmente muy absorbentes a estas longitudes de onda, hasta los fluoróforos.
- b) La luz emitida ha de atravesar los mismos tejidos que la luz excitante, hasta llegar al detector.
- c) Muchos componentes de los tejidos, como por ejemplo el colágeno, son fluorescentes, generando fotones que contaminan la señal de interés.

En resumen, la fluorescencia que es generalmente de un elevado rendimiento cuántico, es de gran utilidad para el seguimiento de trazadores en secciones de tejidos y mucho menos útil para generar imágenes de modo no invasivo en animales vivos a los que se les han implantado células que expresan un determinado fluoróforo.

3.2.4.3. Luminiscencia

La luminiscencia es la producción de fotones de luz como producto de una reacción química¹³⁷ y concretamente, en el caso de la bioluminiscencia los fotones son el producto de una reacción de oxidación de un sustrato catalizada por una enzima.

El ejemplo mejor conocido es el de la luciferasa de *Photinus Piralis* (PLuc) que cataliza la reacción de oxidación de la luciferina (Fig. 33).

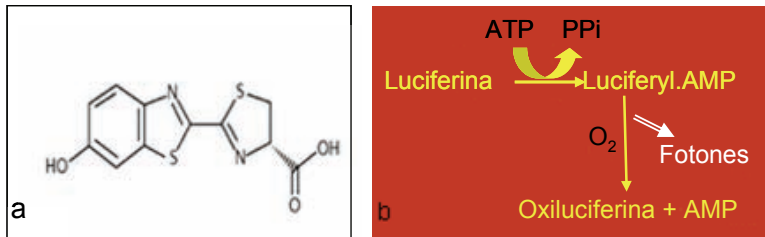


Fig. 33. Estructura de la luciferina, sustrato de algunas luciferasas como la PSUC (a). Reacción catalizada por la PLuc en la cual se obtienen fotones a partir de luciferina y ATP (b).

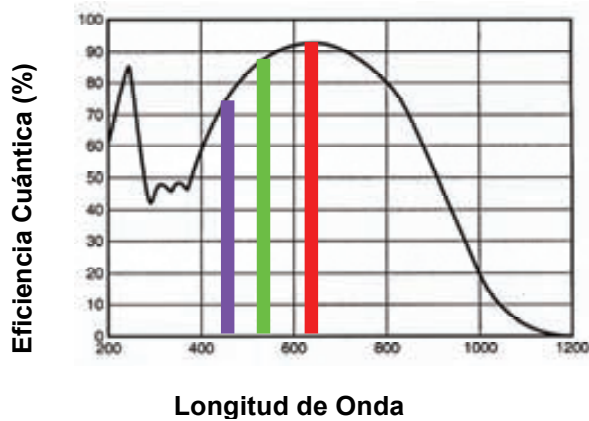


Fig. 34. Espectros de emisión de diferentes luciferasas: PLuc (verde), RLuc (lila), luciferasa de *Pyrophorus plagiophthalmus* (rojo).

Sin embargo, existen muchos tipos de luciferasas (Fig. 34) ampliamente distribuidas en el reino animal desde los protozoarios a los insectos, que utilizan diferentes sustratos. Las luciferasas que emiten un gran porcentaje de los fotones del rojo al infrarrojo (600-900nm) son más ventajosas, ya que la atenuación tisular de los fotones

se minimiza en esta región del espectro. Las luciferasas que utilizan D-luciferina como sustrato, PLuc y luciferasas de algunos escarabajos, han sido muy utilizadas (Fig. 35) ya que su espectro de emisión está entre 540 y 615nm y, por lo tanto, contiene una fracción de fotones emitidos a longitudes de onda superiores a 600nm¹³⁸. Las luciferasas que usan coelenterazina como sustrato, la de *Renilla reniformis* (RLuc) y la de *Gaussia princeps*, se han utilizado en cultivo celular y en animales de experimentación. Estas luciferasas se usan en situaciones donde la dependencia de ATP y la poca estabilidad térmica de la PLuc pueden ser un problema. Sin embargo, estas luciferasas tienen una gran limitación, ya que sus picos espectrales están en la zona azul. Concretamente en la RLuc, el pico está a 481nm y aproximadamente sólo el 3% de los fotones emitidos tienen longitudes de onda superiores a 600nm¹³⁹. Recientemente se ha desarrollado la luciferasa roja a partir de *Pyrophorus plagiophalamus* que emite a 613nm.

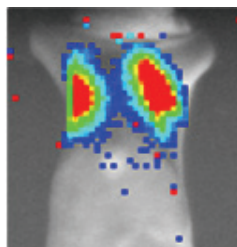


Fig. 35. Imagen ventral de bioluminiscencia de la zona superior de un ratón BALB/c nu/nu, tomada inmediatamente después de haber inyectado intravenosamente, 25.000 células troncales adultas de tejido adiposo que expresan la PLuc. Las células se localizan en los pulmones después de la inyección intravenosa.

Como en el caso de la fluorescencia, la emisión de fotones es evidencia de la presencia del trazador. Las luciferasas tienen múltiples ventajas como trazadores:

- a) Se pueden introducir genéticamente en las células con lo que no se diluyen con la proliferación de éstas.

- b) La cantidad de fotones producidos es proporcional a la cantidad de trazador expresado por las células. Esto permite cuantificar el número de células en función del número de fotones.
- c) Los mamíferos carecen casi por completo de reacciones quimioluminiscentes, por lo que la contribución del organismo al ruido de fondo es prácticamente nula.
- d) Los instrumentos de detección de fotones, además de ser extraordinariamente sensibles, pueden detectar del orden de decenas de fotones y producen respuestas lineales, es decir, directamente proporcionales al número de fotones en un rango de 6 órdenes de magnitud¹⁴⁰.

La principal desventaja de las luciferasas como trazadores es la necesidad de administrar el sustrato, al animal de experimentación, para que la emisión de fotones tenga lugar.

En resumen, mientras que los procedimientos de fluorescencia están bien adaptados para estudios *in vitro* (secciones histológicas, cultivos celulares) donde el ruido de fondo es bajo, para la generación de imágenes en animales vivos, los trazadores bioluminiscentes son claramente superiores.

Los instrumentos para la generación de imágenes no invasivas comprenden una caja oscura o receptáculo hermético, impermeable a los fotones, provisto en la parte superior de una cámara de vídeo de alta sensibilidad generalmente equipada con un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) enfriado, como detector de fotones, y un objetivo que permite enfocar a diferentes distancias. Este equipo está acoplado a un ordenador encargado de la digitalización, almacenamiento y administración de las imágenes.

Debido a la pequeña cantidad de luz que logra pasar a través de los tejidos, es preciso utilizar instrumentos de detección de fotones altamente sensibles¹⁴¹. Los instrumentos utilizados, para generar imágenes fotónicas no invasivas, se basan en detectores

(charge coupled device = CCD) muy parecidos a los de las cámaras de vídeo, pero mucho más sensibles. Estos detectores consisten esencialmente en matrices de fotodetectores en estado sólido que acumulan electrones generados por el impacto de un fotón proveniente del trazador. La imagen se genera mediante la lectura del número de eventos acumulados en la matriz del CCD que se vuelca en la memoria de un ordenador. Debido a que la respuesta del CCD es muy lineal respecto a los fotones incidentes, los CCDs son excelentes instrumentos de medida. Estos dispositivos pueden detectar un número muy bajo de fotones con un rendimiento del 90%, por lo que el principal límite de sensibilidad es el ruido de fondo electrónico del aparato. Debido a que éste es proporcional a la temperatura, los CCDs trabajan en un rango de temperaturas que varía entre los -80 y los -120°C¹²⁹.

Las técnicas ópticas de imagen requieren que las células implantadas en los animales a estudiar expresen el gen trazador para su posterior seguimiento *in vivo*. Una de las estrategias más utilizadas para la incorporación de tales genes, por ejemplo la PLuc, ha sido el uso de vectores víricos. Durante mucho tiempo se han utilizado vectores derivados de los retrovirus para introducir genes que se integran en el genoma de las células, una característica esencial para la expresión a largo plazo. Sin embargo, los vectores retrovíricos sólo permiten transducir células en división, lo cual limita su uso en células no proliferativas como los hepatocitos, miofibrias y células troncales hematopoyéticas¹⁴². Recientemente, otra clase de retrovirus, los vectores lentivíricos (derivados del virus de la inmunodeficiencia humana, VIH), han sido modificados para la transferencia génica. La habilidad de los vectores lentivíricos para transducir todo tipo de células, incluidas las que no están en división, los hace especialmente útiles para introducir material genético en células troncales adultas¹⁴³.

El diagrama de la figura 36 resume la estrategia utilizada en la plataforma de análisis, basada en procedimientos de bioluminiscencia no invasiva (BLI), desarrollada en esta tesis.

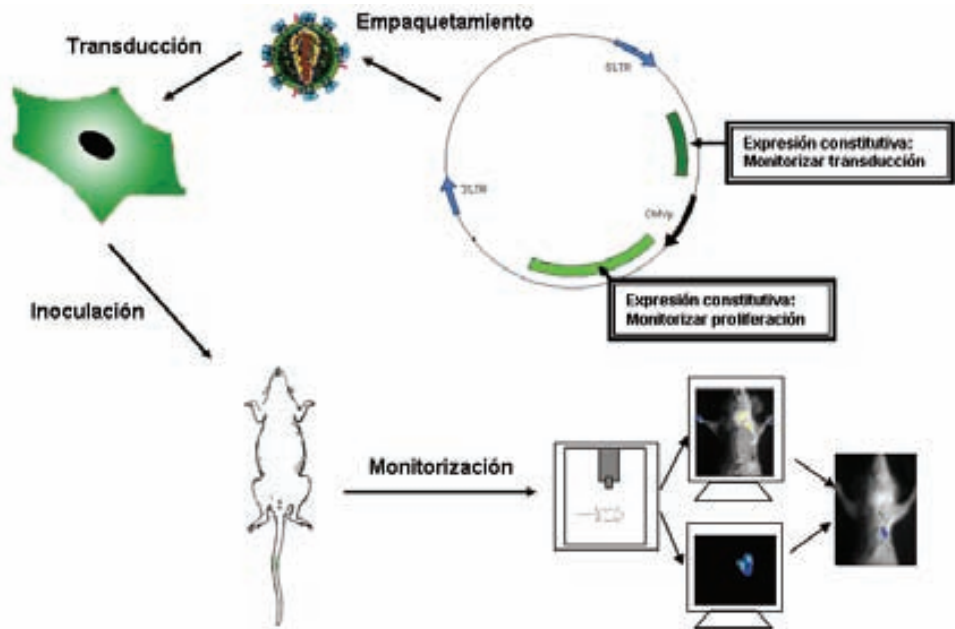


Fig. 36. Las construcciones que contienen los genes trazadores son empaquetadas y los virus formados se utilizan para marcar las células. Posteriormente estas células se seleccionan, se siembran en materiales que son implantados en animales de experimentación y se monitoriza su proliferación mediante procedimientos de BLI.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue establecer una plataforma de análisis *in vivo*, utilizando ratones inmunodeprimidos, que permitiera analizar de una forma no invasiva el comportamiento de diferentes combinaciones de materiales y células para su aplicación en terapia celular o ingeniería de tejidos.

Para lograr este objetivo, se plantearon las siguientes etapas:

1. Caracterizar una línea celular (C3H/10T1/2) como modelo de células progenitoras mediante diferenciaciones *in vitro*.
2. Marcar dicha línea celular con la EFGP y la PLuc mediante vectores víricos, seleccionar las células con mayor expresión de estos trazadores y seguir la expresión de PLuc en estas células *in vitro*.
3. Establecer un modelo ectópico en ratones inmunodeprimidos para analizar diferentes tipos de materiales y células mediante procedimientos de BLI.
4. Analizar diferentes tipos de materiales, sembrados con la línea celular caracterizada previamente, en dicho modelo ectópico y seleccionar el material/es que promuevan mejor la proliferación de las células sembradas.
5. Establecer un modelo de lesión ósea en ratones inmunodeprimidos para analizar el material/es en los que se haya obtenido la máxima proliferación en el modelo ectópico.
6. Obtener células progenitoras humanas de diferentes tejidos y caracterizarlas según su capacidad de proliferación y su potencial de diferenciación *in vitro*.
7. Marcar las células progenitoras humanas con la EFGP y la PLuc mediante vectores víricos, seleccionar las células con mayor expresión de estos trazadores y seguir la expresión de PLuc en estas células *in vitro*.
8. Analizar el comportamiento de diferentes tipos de células progenitoras humanas, con el material/es seleccionados previamente, en un modelo de lesión ósea y evaluar su proliferación y diferenciación *in vivo*.

“A mouse is an animal that, if killed in sufficiently many and creative ways, will generate
a PhD”
Marcellin Boule.

Materiales y Métodos

1. Tipos celulares

1.1. Células C3H/10T1/2

Línea celular embrionaria de ratón (ATCC, Rockville, EEUU) con morfología fibroblástica.

Medio de cultivo:

DMEM D7777 (Sigma, Steinheim, Alemania) suplementado con

1,5 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma)

50 unidades/ml de penicilina/estreptomina (P/S) (Sigma)

10% suero bovino fetal (FBS) (Sigma)

Las células C3H/10T1/2 crecen a 37° C y una concentración del 5% de CO₂.

Esta línea fue utilizada entre los pases 5 y 15 para testar su crecimiento sobre diferentes tipos de materiales *in vivo*. Se comprobó su pluripotencialidad induciendo su diferenciación *in vitro* a cartílago, hueso y tejido adiposo.

1.2. Células C57BL/6

Línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón (ATCC), obtenidos de embrión de 14 días.

Medio de cultivo:

DMEM 4500 glucosa (Sigma) suplementado con

4 mM L-glutamina (Sigma)

50 u/ml P/S

10% FBS

Las células C57BL/6 crecen a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂.

Estas células fueron utilizadas entre los pases 4 y 6 para evaluar su crecimiento *in vivo* una vez sembradas en el hidrogel peptídico BD Puramatrix® (BD Biosciences,

Erembodegem, Bélgica), ya que previamente se había demostrado su crecimiento *in vitro* en este material¹⁴⁴.

1.3. Células BMC-9

Línea celular de médula ósea de ratón generada por James E Dennis (Case Western Reserve University, Cleveland, EEUU) a partir de un ratón transgénico para el antígeno T de SV-40 bajo el control del promotor MHC de clase II.

Para su óptimo crecimiento, las células BMC-9 han de mantenerse a 33° C y una concentración del 5% de CO₂ en el siguiente medio de cultivo:

Alfa-MEM (Sigma) suplementado con

2 mM L-glutamina

50 u/ml P/S

0,025 mg/ml anfotericina B (Sigma)

10% FBS

La línea celular BMC-9 fue utilizada entre los pases 8 y 10 para testar su capacidad de crecimiento y transformación *in vivo*. Se comprobó su pluripotencialidad induciendo su diferenciación *in vitro* a cartílago, hueso y tejido adiposo.

1.4. Células mesenquimales de médula ósea humana (hBMSCs)

Estas células fueron aisladas de muestras de médula ósea de pacientes pediátricos por la Dr. Dimitriou (University of Crete Medical School, Heraklion, Grecia). Se aisló la fracción de células mononucleares utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma). Esta fracción se sembró en placas de cultivo que se mantuvieron a 37° C y una concentración del 5% de CO₂. Las células adheridas al plástico se tripsinizaron y se sembraron a una densidad de 5000 células/cm² en:

MEM (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) suplementado con
2 mM L-glutamina
50 u/ml P/S
10% FBS
1 ng/ml FGF-2 (Abcys SA, París, Francia)

El medio se cambió 2 veces por semana hasta llegar a la confluencia. A partir de ese momento las células se sembraron a una densidad de 1000/cm².

Las hBMSCs se sembraron (en el pase 7) en un material de PEG con péptidos RGD covalentemente unidos (PEG-RGD) para evaluar su crecimiento y diferenciación en una lesión ósea *in vivo*. Se comprobó su pluripotencialidad induciendo su diferenciación *in vitro* a hueso y tejido adiposo.

1.5. Células mesenquimales de tejido adiposo humano (hAMSCs)

Para la obtención de las hAMSCs se utilizaron muestras de tejido procedentes de intervenciones de liposucción. Estas muestras se lavaron en PBS 1X y se incubaron en un volumen de solución de colagenasa I (Sigma) a 37° C durante 30 minutos con agitación. Se añadió un volumen de DMEM 4500 glucosa suplementado con 10% de FBS y la suspensión celular se centrifugó a 450 g durante 10 minutos. El precipitado celular se lavó en Ringer buffer (Sigma) y se resuspendió en 10 ml de cloruro de amonio (Sigma) a 0,16 M, incubándose en estas condiciones durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 40 ml de lactato de Ringer a la suspensión celular y se centrifugó durante 10 minutos a 450 g. Las células se sembraron a una concentración de 5000/cm² y se mantuvieron a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂ en el siguiente medio de cultivo:

DMEM 4500 glucosa suplementado con
2 mM L-glutamina

50 u/ml P/S

10% FBS

Las hAMSCs se sembraron (en el pase 7) en un material de PEG-RGD para evaluar su crecimiento y diferenciación en una lesión ósea *in vivo*. Se comprobó su pluripotencialidad induciendo su diferenciación *in vitro* a hueso y tejido adiposo.

1.6. Células 293 GPG

Línea celular cedida por el Dr. D Ory (Washington University, Washington, EEUU). Las células 293 GPG derivan de células hepáticas de embriones humanos y expresan la proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular G (VSV-G) bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), el cual se encuentra regulado por tetraciclina.

Las células se mantuvieron a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂.

Medio de cultivo:

DMEM 4500 glucosa suplementado con

2 mM L-glutamina

50 u/ml P/S

10% FBS

1 µg/ml tetraciclina (Sigma)

2 µg/ml puromicina (Sigma)

0,3 mg/ml neomicina (Invitrogen)

Estas células se utilizaron para la producción de retrovirus.

1.7. Células 293 T

Línea celular derivada del epitelio renal humano embrionario (ATCC). Estas células permiten la replicación episomal de plasmidios y expresan el antígeno SV40 *large T* que les proporciona la propiedad de ser altamente transfectables con cloruro de calcio.

Las células 293T se utilizaron para la producción de lentivirus y se mantuvieron a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂.

Medio de cultivo:

DMEM 4500 glucosa suplementado con

2 mM L-glutamina

50 u/ml P/S

10% FBS

25 mM Hepes (Sigma)

2. Diferenciación de las células en cultivo

Para testar la capacidad de los tipos celulares utilizados de diferenciarse a uno o más linajes *in vitro*, se sembraron las células a concentraciones definidas y se mantuvieron durante 21 días en cultivo con medios de diferenciación específicos para tejido adiposo, cartilaginoso y óseo.

2.1. Diferenciación a tejido adiposo

Se sembraron las células a diferenciar en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo de cada tipo celular, a una densidad de $8 \cdot 10^4$ células/cm², excepto en el caso de las BMC-9 que se sembraron a $5 \cdot 10^3$ células/cm² debido a su gran capacidad proliferativa.

Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación:

DMEM según el medio del tipo celular

20% FBS

0,5 mM isobutimetilxantina (Sigma)

10^{-6} M dexametasona (Sigma)

100 nM rozigitazone (Caiman Chemical, Ann Arbor, EEUU)

Se cambió el medio cada 3 días durante 3 semanas.

2.2. Diferenciación a hueso

Se sembraron las células a diferenciar en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo de cada tipo celular, a una densidad de $1,5 \cdot 10^4$ células/cm², excepto en el caso de las BMC-9 que se sembraron a $2 \cdot 10^3$ células/cm².

Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación:

DMEM según el medio del tipo celular

10% FBS

2 mM β -glicerolfosfato (Sigma)

50 µg/ml ácido L-ascórbico (Sigma)

10^{-7} M dexametasona

Se cambió el medio cada 3 días durante 3 semanas.

2.3. Diferenciación a cartilago

La diferenciación a tejido cartilaginoso se realizó con células en placa (células C3H/10T1/2) y con microrecipitado.

Para la diferenciación de células en placa se sembraron las células C3H/10T1/2 en placas de 24 pocillos a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células/cm² en su medio de cultivo. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio completo de diferenciación.

La diferenciación del microprecipitado se realizó con $2,5 \cdot 10^5$ células del tipo celular a diferenciar y se mantuvo 3 semanas con medio completo de diferenciación. El microprecipitado se obtuvo según el siguiente protocolo:

- Se tripsinizaron las células a diferenciar, se centrifugaron a 350 g durante 5 minutos y se resuspendieron en medio incompleto.
- Se centrifugaron a 350 g durante 5 minutos y se resuspendieron las células en medio completo a una concentración de $5 \cdot 10^5$ células/ml.
- Se depositaron 500µl de la suspensión celular ($2,5 \cdot 10^5$ células) en tubos de 15 ml.
- Se centrifugó a 350 g durante 5 minutos para formar el precipitado celular en el fondo del tubo, creando así el microprecipitado. Se dejaron los tubos a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂ con el tapón un poco desenroscado para permitir el intercambio de gases.
- Al día siguiente se golpeó suavemente el fondo del tubo para separar el microprecipitado del tubo.
- Se cambió el medio cada 2-3 días hasta el día 21.

Medio incompleto:

DMEM según el medio del tipo celular

1 mM dexametasona

0,1 M piruvato de sodio (Sigma)

17 mM ácido L-ascórbico

35 mM prolina (Sigma)

2 μ l/ml solución de insulina-transferrina-selenio 100X (ITS) (Sigma)

Medio completo:

Añadir al medio anterior BMP-2 (Prepotech, London, Inglaterra) a 100 ng/ml o

TGF- β 1 (Prepotech) a 10 ng/ml.

3. Producción vírica y marcaje

Para incorporar establemente los genes de las proteínas trazadoras EGFP y PLuc en los tipos celulares a estudiar con la finalidad de poder monitorizarlas mediante BLI, se utilizaron vectores víricos. Estos vectores permiten la incorporación estable de los genes, así como una alta eficiencia de transducción del tipo celular.

La finalidad de este doble marcaje era poder monitorizar la transducción viral mediante la EGFP y la proliferación celular *in vivo* mediante la PLuc.

3.1. Marcaje retrovítico

El marcaje celular de la línea C3H/10T1/2 se realizó con el vector retrovítico (prEGFP-CMV-PLuc) (Fig. 37) que contenía la secuencia de la proteína EGFP bajo el control del LTR en posición 5' del vector retrovítico y la secuencia de la proteína PLuc bajo el control del promotor de CMV. Para la construcción de este vector, se obtuvo el gen de la PLuc del vector pSP-luc+ (Promega Corporation, Madison, EEUU) y se clonó en el vector pRC/CMV (Invitrogen). Posteriormente, el promotor CMV y el gen de la PLuc se insertaron en el vector pSFB91EGF (cedido por el Dr. C. Baum).

3.1.1. Producción de partículas retrovíticas

- Se tripsinizaron las células 293 GPG y se sembraron en placas de 6 cm, a una concentración de $3,5 \cdot 10^4$ células/cm², el día antes de la transfección para que al día siguiente la confluencia fuera del 90-95%.
- Se mezclaron (por placa) 4 µg de la construcción de la que queremos obtener los virus con 16 µl de *Plus reagent* (Invitrogen) y se llevó a un volumen de 150 µl con DMEM. Se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Se añadieron a la mezcla 150 µl de *Lipofectamine* (Invitrogen), diluida al 8% en DMEM y se incubó 15 minutos más a temperatura ambiente.

- Se aspiró el medio de las placas y se lavó dos veces con DMEM. A partir de este paso el medio utilizado no contenía tetraciclina para asegurar la expresión de la proteína de la envuelta VSV-G.
- Se añadió 1,2 ml de DMEM a la mezcla de *Lipofectamine* y se repartió en cada placa. Se dejó durante 8 horas a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂.
- Se aspiró el medio el medio y se añadió 1,5 ml de DMEM con 20% de FBS y 2 mM de L-glutamina por placa.
- Se cambió el medio al día siguiente, por DMEM con 10% FBS y 2 mM de L-glutamina y se recogió el sobrenadante cada 24 horas hasta las 120 horas.
- Los sobrenadantes recogidos se filtraron, para no arrastrar células 293 GPG, con un filtro de 0,45 µm (Sartorius, Goettingen, Alemania) y se congelaron en alícuotas de 1 ml a -80°C.

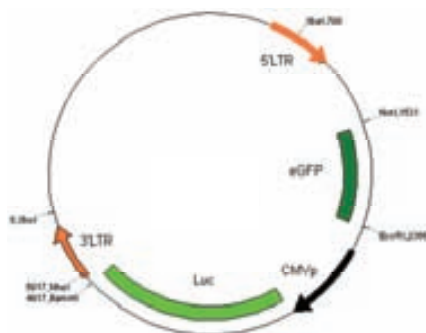


Fig. 37. Esquema del vector retrovítico prEGFP-CMV-Pluc.

3.1.2. Producción de células establemente marcadas con genes de interés

- Se sembraron $3 \cdot 10^3$ células/cm² en placas de 12 pocillos el día previo a la transducción.
- Se mezcló una alícuota de sobrenadante retrovítico (preferentemente del obtenido entre las 48 y 96 horas) con 100 µl de sulfato de protamina (Sigma) a 0,05 mg/ml, se

añadió esta mezcla a cada pocillo y se dejó durante 8 horas a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂.

- Se retiró el medio y se añadió el medio de cultivo del tipo celular a marcar.
- Se repitió la transducción con sobrenadante vírico los dos días siguientes.
- Se observó la proporción de células marcadas dos días después de la transducción.

Las células se observaron con un microscopio de fluorescencia Leica DMIRE2 (Leica, Wetzlar, Alemania) utilizando el canal de detección de EGFP (excitación: 515 - 560 nm, emisión: 590 nm).

3.2. Marcaje lentivírico

Debido a que se detectó que el marcaje retrovírico no se mantenía estable a lo largo del tiempo y, que además, sólo es útil para marcar células que proliferan activamente, se decidió utilizar en su lugar el marcaje lentivírico que permite transducir las células aunque no estén en fase proliferativa. Este marcaje se utilizó con las líneas celulares C57BL/6 y BMC-9 y con los cultivos primarios de hBMSCs y hAMSCs.

El vector lentivírico que se utilizó (Fig. 38), contenía el gen de la EGFP bajo el control del promotor del virus de simio 40 (SV40) y el gen de la PLuc bajo el control del promotor CMV. La construcción se realizó clonando ambos genes trazadores con sus respectivos promotores entre los lugares ClaI y BamHI del vector lentivírico Plox/Twrgf cedido por el Dr. D Trono (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland).

3.2.1. Producción de partículas lentivíricas

- Se trataron las placas de 10 cm² de diámetro, donde se iban a sembrar las células 293T, con poli-D-lisina (Sigma) diluida al 1% en agua estéril durante 30 minutos.
- Se lavaron las placas con PBS 1X dos veces.

- Se tripsinizaron las células 293T y se sembraron células a una concentración de $5,5 \cdot 10^4$ células/cm² en placas previamente tratadas. Se dejaron con medio de cultivo 293T.
- A las 24 horas se cambió el medio (2 horas antes de la transfección).
- En la transfección se emplearon tres construcciones:
 1. pLOX SIN → vector de expresión del gen de interés que contiene: las secuencias del VIH en *cis* necesarias para el empaquetamiento del virus, la transcripción reversa y la integración (Fig. 35).
 2. pMD-G-VSV-G env → plásmido que expresa la proteína de envuelta del virus bajo el control del promotor CMV.
 3. pCMVDR8.2 → plásmido que expresa todas las proteínas del VIH-1 en trans.

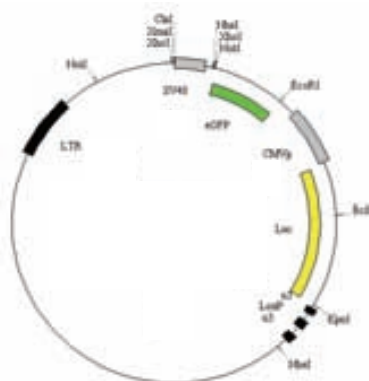


Fig. 38. Esquema del vector lentivírico pLOX SIN.

Se mezclaron (por placa) 15 µg del vector 1, 5 µg del vector 2, 10µg del vector 3, 450 µl de agua y 50 µl de cloruro de calcio (Sigma) a 2,5 M y se añadió la mezcla a 500 µl de HeBS 2X (NaCl (Merck, Darmstadt, Alemania), HEPES y Na₂HPO₄ (Sigma)) a pH7. Se dejó a temperatura ambiente 20 minutos.

- Se añadió esta mezcla a las células 293T y se dejó durante 16 horas a 37° C y 5% CO₂.

- Se lavaron las células con PBS y se mantuvieron en medio de cultivo sin FBS.
- Después de 48 horas de cultivo, el medio se recogió y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos.
- El sobrenadante obtenido se filtró mediante un filtro de 0,45 μm y se ultra-centrifugó a 26000 rpm y a 4° C durante 90 minutos con el rotor SW41.Ti en una ultracentrifuga L-100XP (Beckman Coulter, California, EEUU).
- El precipitado correspondiente a los virus, se resuspendió en PBS 1X (50 μl por cada placa transfectada) y se congeló en alícuotas de 50-100 μl a -80°C.
- Se realizó la titulación vírica mediante el kit HIV-1 p24 antigen EiA (Beckman Coulter).

3.2.2. Producción de células establemente marcadas con genes de interés

- Se sembraron $3 \cdot 10^3$ células/cm² en placas de 12 pocillos el día previo a la transducción.
- Se mezcló un volumen de los virus resuspendidos en PBS 1X (MOI (partículas víricas infecciosas/célula) = 21) con 1 ml del medio de cultivo del tipo celular a marcar que contenía 10 $\mu\text{g/ml}$ de polybrene (Sigma) y se añadió a cada pocillo.
- Se cambió el medio 48 horas más tarde por medio fresco y se dejaron crecer las células.
- Se observó la eficiencia de transducción vírica a los 2 días usando un microscopio de fluorescencia.

3.3. Selección de las células marcadas

Para tener una buena sensibilidad en los ensayos *in vivo*, es decir, para poder detectar un pequeño número de células en los animales mediante procedimientos de BLI es

esencial un alto rendimiento en el marcaje. Es por ello que se seleccionaron las células más marcadas (usando la expresión de EGFP) mediante un clasificador de proteínas fluorescentemente activadas (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS). Dependiendo del tipo celular y de su capacidad proliferativa la selección de la población celular fluorescente fue más o menos estricta, variando en los diferentes tipos celulares entre un 5 y un 35%.

3.4. Curvas estándar *in vitro*

Para determinar la actividad luciferasa de las células marcadas se hicieron curvas estándar a partir de homogeneizados celulares conteniendo números de células conocidos, según el siguiente protocolo:

- Se tripsinizaron las células marcadas y se contaron $2 \cdot 10^5$ células. Se centrifugaron, se resuspendieron en 200 μ l de Reporter Lysis Buffer 1X (RLB) (Promega) y se congelaron a -20° C.
- Se descongeló el lisado y se hicieron diluciones para tener en 20 μ l de lisado el equivalente a 10, 50, 250, 500 y 1000 células.
- Se mezclaron 20 μ l de lisado con 100 μ l de luciferina (Promega) y se midió la producción de luz en un luminómetro (Berthold detection systems, Pforzheim, Alemania) durante un tiempo de 10 segundos.

Las medidas de luz se expresaron en unidades relativas de luz (RLUs). La capacidad de producción de luz *in vitro* de los diferentes tipos celulares se determinó como la pendiente de la curva estándar al representar las RLUs respecto al número de células.

3.5. Seguimiento del marcaje *in vitro*

Para poder relacionar el número de células con la luz obtenida después de implantar las células en los animales, es muy importante que la expresión de PLuc se mantenga estable. Es por ello que después de marcar cada tipo celular se mantuvo un cultivo *in*

vitro paralelamente al experimento *in vivo* para monitorizar la producción de PLuc del cultivo a lo largo del tiempo, según el siguiente protocolo:

- Se tripsinizó cada 15 días el cultivo celular, se contaron $2 \cdot 10^5$ células, se resuspendieron en 200 μ l RLB 1X y se congelaron los lisados a -80° C.
- Se determinó la actividad luciferasa (apartado 3.4.) y la concentración de ADN (apartado 3.5.1) de una alícuota de cada lisado.
- Se representó el logaritmo de las RLUs/ng de ADN, frente a tiempo de cultivo.

3.5.1. Cuantificación de ADN de cultivo celular

Para cuantificar el ADN en los lisados celulares se usó el kit Quant-iT DNA Broad-Range (Invitrogen).

- Se preparó la solución de trabajo diluyendo Quant-iT DNA BR 1:200 en Quant-iT DNA BR buffer y se dispensaron 200 μ l de esta solución en cada pocillo de una placa de 96.
- Se añadió a cada pocillo 10 μ l de los estándares que incluye el kit o 10 μ l de la muestra de la que queríamos cuantificar el ADN y se mezcló sin hacer burbujas.
- Se midió la fluorescencia con un lector de placas (Wallac VICTOR², PerkinElmer, Massachusetts, EEUU) usando máximos de excitación/emisión $\approx 510/527$ nm.
- Se realizó una curva estándar con las medidas de fluorescencia de los patrones y se calculó la cantidad de ADN en los lisados celulares.

4. Biomateriales de soporte para el crecimiento celular

Se utilizaron una serie de materiales con diferentes características químicas y estructurales para investigar cual de ellos permitía la mayor proliferación y diferenciación de las células sembradas.

4.1. Hidrogel de gelatina-glutaraldehído

Este hidrogel ha sido desarrollado y cedido por el grupo de la Dra. E Livne (Faculty of Medicine, Haifa, Israel). El material se preparó^{150,151} mezclando una solución acuosa estéril al 10% de gelatina bovina (Nitta Gelatin Co., Osaka, Japón) a pH 5,0 con glutaraldehído a 12,5 mM durante 24 horas a 4° C en placas de 6, 24 o 96 pocillos. El material se liofilizó y esterilizó en las placas antes de sembrar las células.

Protocolo de sembrado:

- Se tripsinizaron las células a sembrar y se resuspendieron 10^6 células en 200 μ l de medio de crecimiento (volumen para un hidrogel de 2,3 cm de diámetro).
- Se depositó la solución celular gota a gota sobre el hidrogel liofilizado y se dejó la placa que contenía el hidrogel durante 40-50 minutos a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂.
- Se añadió medio hasta llenar el pocillo.
- A las 24 horas el hidrogel había incorporado gran parte del volumen de medio y se añadió más. Se cambió el medio cada 2-3 días.

4.2. Hidrogel peptídico de RAD16-I

Éste hidrogel se preparó a partir del péptido comercial BDTM PuramatrixTM (BD Biosciences). El péptido, con la secuencia AcN-(RADA)₄-CONH₂ (RAD16-I), se

autoensambla al entrar en contacto con una solución que contenga electrolitos, como por ejemplo el medio de cultivo¹⁴⁹. Al autoensamblarse el péptido RAD16-I pasa de un estado líquido a formar un hidrogel de nanofibras de varios μm de longitud y 6-8 μm de grosor.

Protocolo de sembrado:

- Se prepararon soluciones de sacarosa al 10 y al 20% y se esterilizaron por filtración.
- Se tripsinizaron las células a sembrar y se resuspendieron en sacarosa al 10% (Sigma), quedando a una concentración de $2 \cdot 10^4$ células/ μl .
- Para facilitar la formación del hidrogel, se colocó en cada pocillo de una placa de 12, un pocillo de 12 mm de diámetro con una membrana en la parte inferior tratada para el crecimiento celular (inserto) (Millipore, Billerica, EEUU) *.
- Se sonicó el péptido durante 10 minutos.
- Se mezcló (por hidrogel de 150 μl a formar): 75 μl de péptido sonicado**, 60 μl de sacarosa al 22% y 15 μl de la suspensión celular en sacarosa al 10%.
- Se colocaron 150 μl de la mezcla anterior en cada inserto e inmediatamente se añadieron 300 μl de medio entre el inserto y el pocillo, de manera que la mezcla del inserto estaba en contacto con el medio de cultivo por la parte inferior. Se dejó a 37° C y a una concentración del 5% de CO_2 durante 10 minutos.
- Se cambió el medio de exterior del inserto y se añadió sobre el hidrogel formado 200 μl de medio. Se dejó a 37° C y a una concentración del 5% de CO_2 durante 20 minutos.
- Se cambió el medio interior y exterior del inserto y se dejó a 37° C y a una concentración del 5% de CO_2 durante 30 minutos.
- Se cambió el medio interior y exterior del inserto.
- A las 24 horas se hizo otro cambio de medio y a partir de este momento se cambió cada 2 o 3 días según la proliferación celular.

*En algunos casos en este paso se colocó en el fondo del inserto el material *biorubber* para proporcionar un soporte estructural al hidrogel de RAD16-I. El *biorubber* es una estructura porosa de poli(diol citrato) sintetizada por David Horna (Institut Químic de Sarrià, Barcelona). El primer paso de la síntesis es la formación de un pre-polímero al mezclar cantidades equimolares de ácido cítrico (Sigma) y de 1,8-octanediol (Sigma) y mantener la mezcla a 100° C durante 6 minutos con agitación. El segundo paso consiste en incubar poliestireno (Goodfellow, Huntington, Inglaterra) a 100° C 2 minutos. A continuación el pre-polímero se añade al poliestireno y se mantiene a 120° C al vacío durante 4 días para crear el *biorubber*. El poliestireno se extrae mediante tolueno (Sigma). Finalmente el *biorubber* se esteriliza mediante lavados con PBS y etanol al 70% durante 2 días.

**Se utilizó el péptido RAD16-I comercial para las implantaciones en ratones BALB/c nu/nu y para facilitar su detección en las implantaciones en ratones BALB/c, se utilizó dicho péptido tratado con biotina (RAD16-Ib). La concentración final de biotina en el péptido RAD16-Ib era del 0,5%.

4.3. Hidrogel de PEG

El macrómero de PEG ($H(OCH_2CH_2)_nOH$) es un polímero biocompatible. El hidrogel de PEG se forma al mezclar 1:1 una solución de PEG-Acrylate (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL, EEUU) al 15% con una solución de PEG-Thiol (Nektar Therapeutics) al 7,5%.

Protocolo de sembrado:

- Se preparó una solución acuosa de Triethanolamine (TEOA) (Fluka, St.Gallen, Suiza) a 0,3 M y pH 8,5 y se esterilizó por filtración
- Se preparó una solución de PEG-Acrylate en TEOA al 15% y otra de PEG-Thiol en TEOA al 7,5%. Se pipeteó hasta disolver y se centrifugó a 1200 rpm durante 2 minutos.

- Se pasaron estas soluciones tres veces a través de una jeringa de insulina.
- Se tripsinizaron las células a sembrar y se resuspendieron en medio para tenerlas a una concentración de $1,8 \cdot 10^6$ células/ml.
- Se depositó en cada pocillo de una placa de 48, 110 μ l de suspensión celular.
- Se mezclaron 1:1 las soluciones de PEG-Acrylate y PEG-Thiol e inmediatamente se repartieron 300 μ l por pocillo.
- Se dejó la mezcla a temperatura ambiente 5 minutos y luego a 37° C y una concentración del 5% de CO₂ durante una hora para que acabara de gelificar.
- Se añadió medio hasta llenar el pocillo. Se cambió el medio cada 2 o 3 días.

4.4. Hidrogel de PEG-RGD

Este hidrogel¹¹⁸ ha sido desarrollado por el grupo del Dr. JA Hubbell (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Suiza). Consiste en macrómeros de polietilenglicol de 4 brazos (Fig. 39) funcionalizados con péptidos de unión sensibles a MMPs y con péptidos RGD que permiten que las células invadan el material. La migración celular depende de la actividad proteasa sobre los péptidos de unión que unen las moléculas de PEG.

Se recibieron, del grupo del Dr. JA Hubbell, alícuotas de PEG-RGD al 7% y alícuotas del péptido de unión liofilizadas y estériles.

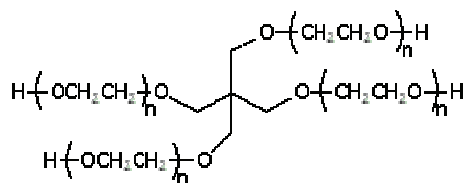


Fig. 39. Estructura y composición del polietilenglicol de 4 brazos.

Protocolo de sembrado:

- Se preparó una solución acuosa de TEOA (Fluka) a 0,3 M y pH 8 y se esterilizó por filtración.

- Se tripsinizaron las células a sembrar y se resuspendieron en medio de cultivo a una concentración de $15 \cdot 10^6$ células/ml.
- Se sumergieron dos portas (por hidrogel a formar) en Sigmacote (Sigma) tres veces, dejando secar los portas antes de sumergir de nuevo.
- Se limpiaron brevemente los portas con etanol al 70%.
- Se unieron cinco cubres (dos juegos de cinco cubres por hidrogel a formar) con cinta adhesiva. Se dejó preparado un porta con Sigmacote y encima un juego de cinco cubres unidos en cada extremo del porta de manera que la parte central del porta quedaba libre.
- Se puso en hielo una alícuota de PEG-RGD 7%, una alícuota de péptido de unión, el TEOA, PBS 1X y se realizó la siembra siempre sobre hielo y deprisa.
- Se añadieron 20 μ l de PBS 1X a la alícuota de PEG-RGD al 7%, se vortexó y se dejó otra vez en hielo.
- Se añadieron 49,6 μ l de TEOA a la alícuota del péptido de unión, se vortexó y se dejó en hielo.
- Se añadieron 20 μ l de la suspensión celular al péptido de unión resuspendido.
- Se añadieron 132 μ l del PEG-RGD resuspendido en el tubo del péptido de unión, se mezcló y se depositó todo el volumen obtenido en el centro del porta previamente preparado. *
- Se cubrió el porta con el otro porta tratado con Sigmacote y se aseguró con una pinza en cada extremo. Se dejó a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂ durante 15 minutos.
- Se retiró el hidrogel formado con una espátula y se depositó en un pocillo de una placa de 12 con 1 ml de medio. Se dejó a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂ durante 30 minutos.
- Se hicieron pequeños geles, a partir del hidrogel formado, con la ayuda de un Biopsy Punch (Stiefel, Madrid, España) y se depositaron en pocillos de una placa de 96 con medio de cultivo. Se cambió el medio cada dos o tres días.

* La mezcla, en lugar de depositarse en el porta, puede ser directamente inyectada en el animal de experimentación, la solidificación del hidrogel tiene lugar en 5 minutos aproximadamente.

4.5. Esferas de alginato

Las gotas gelificadas de alginato se forman al entrar en contacto una solución que contenga NaCl con otra de CaCl₂.

Protocolo de sembrado:

- Se prepararon soluciones acuosas de NaCl (Sigma) al 0,15 M y CaCl₂ (Sigma) al 100 mM y se esterilizaron por filtración.
- Se preparó una solución de alginato (Low-viscosity alginate, Sigma) al 1,2% en NaCl al 0,15 M y se esterilizó por filtración.
- Se tripsinizaron las células a sembrar y se resuspendieron en la solución de alginato/NaCl para que quedaran a una concentración de $4 \cdot 10^6$ células/ml.
- Se pasó la suspensión celular a través de una jeringa con una aguja de 23G y se dejó caer gota a gota sobre la solución de CaCl₂. Se mantuvieron las gotas en la solución de CaCl₂ durante 10 minutos para que las esferas polimerizaran completamente.
- Se lavaron las esferas en la solución de NaCl cuatro veces.
- Se lavaron las esferas en medio de cultivo una vez y se dejaron con medio fresco a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂. Se cambió el medio dos o tres veces en semana según la proliferación celular.

4.6. Esferas Cytodex™ 3

Las esferas Cytodex™ 3 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) son esferas transparentes que miden entre 141-211 µm y poseen una capa de colágeno porcino desnaturalizado sobre la superficie de la matriz porosa.

Protocolo de sembrado:

- Hidratación y esterilización
 - Se mezclaron 50-100 ml de PBS 1X por gramo de Cytodex™ 3 y se mantuvieron 3 horas a temperatura ambiente con agitación.
 - Se lavaron las esferas con PBS 1X.
 - Se lavaron 2 veces con etanol al 70%.
 - Se incubaron las esferas 24 horas con etanol al 70%.
 - Se lavaron con PBS 1X estéril 3 veces y una vez con medio de cultivo.
- Equilibrio
 - Se colocaron las esferas hidratadas en medio de cultivo fresco 30 minutos a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂ antes de sembrarlas.
- Siembra del material
 - Se colocaron las esferas hidratadas en 1/3 del volumen final de cultivo (0,5-5 mg/ml).
 - Se tripsinizaron las células a sembrar y se añadieron a las esferas quedando a una concentración de $4,6 \cdot 10^5$ células/mg Cytodex™ 3. Se mantuvo el cultivo en agitación continua (40-60 rpm) a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂.
 - Se añadió el resto del medio a las seis horas del inicio del cultivo.
 - Se cambió el 50% del medio cada tres días.

4.7. Esferas PAMs

Las esferas farmacológicamente activas (pharmacologically active microcarriers PAMs¹⁴⁸), desarrolladas y cedidas por el grupo de la Dr. CN Montero-Menei (Centre Hospitalier Universitaire, Angers, Francia), tienen un diámetro aproximado de 60µm. Están compuestas de ácido poli (D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) y recubiertas con una mezcla de poli-D-lisina (3,5 µg/cm²) y de fibronectina (5 µg/cm²).

Se recibieron del grupo de la Dr. CN Montero-Menei las esferas PAMs liofilizadas y estériles.

Protocolo de sembrado:

- Se tripsinizaron las células a sembrar y se lavaron dos veces en medio sin FBS.
- Se añadieron las células a las esferas PAMs, a una concentración de 10^6 células por mg de PAMs, en un eppendorf.
- Se colocó el eppendorf en un agitador orbital, a 37° C y a una concentración del 5% de CO_2 , y se mantuvo a 6 rpm durante dos horas.
- Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 segundos para separar las células no unidas a las PAMs.
- Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con medio suavemente. Se colocaron las PAMs sembradas con una punta de pipeta recortada en pocillos de una placa de 24 para continuar el cultivo.
- Se cambió el medio cada dos o tres días.

4.8. Soporte de quitosano

El material basado en quitosano^{149,150} utilizado, fue desarrollado y facilitado por el grupo del Dr. NM Neves (University of Minho, Braga, Portugal). Este material está compuesto por quitosano (obtenido a partir de quitina animal) y por poli(butileno succinato) en una proporción del 50% cada uno. Se caracteriza por tener una porosidad del 80%.

Se recibieron del grupo del Dr. NM Neves matrices de quitosano en forma de cubos y discos esterilizados.

Protocolo de sembrado:

- Se sumergieron las matrices, el día antes de sembrar las células, en 30 ml de medio sin FBS en un falcon de 50 ml y se eliminó el aire generando vacío.
- Se dejaron las matrices en medio sin FBS 12 horas.

- Se tripsinizaron las células a sembrar y se resuspendieron en medio para obtener una concentración de $25 \cdot 10^6$ células/ml.
- Se colocaron las matrices en placas no tratadas para el cultivo celular.
- Se depositaron 10-20 μ l de la suspensión celular en la superficie de cada matriz. Se pipeteó el volumen de suspensión que difundía a través de la matriz y se volvió a depositar sobre la misma. Se repitió hasta que todo el volumen fue absorbido por la matriz.
- Se colocaron las placas a 37° C y a una concentración del 5% de CO₂ durante 1-2 horas.
- Se colocaron las matrices sembradas en pocillos de una placa de 24 y se añadió medio hasta que la matriz quedó totalmente cubierta.
- Se cambió el medio cada 2 o 3 días.

4.9. Monitorización de la proliferación celular en los biomateriales *in vitro*

La proliferación celular *in vitro* se observó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio de fluorescencia Leica DMIRE2 (Leica, Wetzlar, Alemania) y el canal de detección de EGFP (excitación: 515 - 560 nm, emisión: 590 nm).

En algunos casos en los que no se podían visualizar las células de esta forma, debido a la elevada auto-fluorescencia de los materiales, se utilizó microscopía confocal para observar la distribución tridimensional de las células en los materiales antes y/o después de su implantación. En este caso se utilizó el microscopio Leica DMIRE2 (Leica) y las condiciones de la microscopía confocal fueron:

- Objetivo 63 X sin zoom
- Laser de color verde, canal GFP: excitación = 515 - 560 nm y emisión = 590 nm.

5. Modelos animales

Para evaluar el crecimiento de las células sembradas sobre los diferentes biomateriales, su capacidad para regenerar una lesión ósea y el comportamiento de las células del huésped en esta lesión, se desarrollaron dos modelos en ratones, un modelo ectópico (subcutáneo (SC) y/o intramuscular (IM)) y un modelo de lesión ósea. Para evaluar la posible alteración oncogénica del tipo celular BMC-9 se utilizó un modelo de transformación celular.

5.1. Tipos de ratones utilizados

Para seguir la proliferación, diferenciación y transformación de células sembradas en biomateriales *in vivo* se utilizaron ratones BALB/c nu/nu (Charles-River, Wilmington, EEUU), los cuales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos. Estos ratones¹⁵⁵ tienen una mutación genética que consiste en la disrupción del gen FOXP1, no tienen timo y por ello su sistema inmune está inhibido ya que tienen un número muy reducido de células T. Estos ratones pueden ser transplantados con diferentes tipos de tejidos o tumores ya que no producen rechazo.

Para determinar la biocompatibilidad de algunos materiales se utilizaron ratones BALB/c (Charles-River), los cuales se mantuvieron en condiciones estándar. Estos ratones son consanguíneos, albinos e inmunocompetentes.

En el estudio del comportamiento de las células del huésped en una lesión ósea se utilizaron ratones C57BL/6 transgénicos para la expresión de la GFP. Los ratones C57BL/6 son ratones consanguíneos e inmunocompetentes y por tanto se mantuvieron en condiciones estándar.

Todos los protocolos animales utilizados en esta tesis fueron aprobados previamente por el comité ético del Centro de Investigación Cardiovascular (CIC) y por el Gobierno de Cataluña.

5.2. Modelo ectópico

5.2.1. Seguimiento de células sembradas en biomateriales

Para el seguimiento de las células implantadas *in vivo* se usaron ratones BALB/c nu/nu de 6 semanas de edad.

Se realizó un modelo ectópico SC, en el cual se colocaron 3 implantes subcutáneamente en la espalda de cada animal, y un modelo ectópico SC e IM. En este último, se colocaron cuatro implantes por animal, dos SC en la espalda y dos IM, uno en cada muslo. Así en cada ratón se probaron dos materiales uno en la parte derecha y otro en la izquierda, con dos localizaciones diferentes de cada material, la SC y la IM.

Protocolo:

- Se anestesiaron los animales, mediante una inyección intraperitoneal (IP), con 100 mg/kg de ketamina (Merial, Duluth, EEUU) y 3,3 mg/Kg de xilacina (Henry Schein, Melville, EEUU).
- Se administró analgesia, mediante una inyección SC, con 0,05 mg/kg de buprenorfina (Schering-Plough, Kenilworth, EEUU).
- Se inmovilizaron los animales boca abajo y se aplicó un antiséptico (povidone-iodine, Braun, Melsungen, Alemania) en las zonas donde se iban a colocar los implantes.
- Se realizó una incisión en la piel de la espalda (implante SC) o en el muslo, donde se realizó un pequeño “bolsillo”.
- Se introdujo el material sembrado con células (volumen de 30µl aproximadamente) con una punta de pipeta recortada, excepto el hidrogel de PEG-RGD que se inyectó directamente (ya que estaba en forma líquida y polimerizaba una vez implantado en el animal de experimentación) y el soporte de quitosano que se introdujo con la ayuda de unas pinzas.
- Se cosió el músculo primero y luego la piel (implante IM) o bien la piel (implante SC) con suturas de seda trenzada 5-0 Mersilk (Ethicon, New Brunswick, EEUU).

El control consistió en inyectar en localizaciones SC e IM, en un volumen de 50 µl, las células marcadas usadas para sembrar los materiales implantados, resuspendidas en medio sin FBS.

5.1.2. Biocompatibilidad de materiales

En la determinación de la biocompatibilidad de algunos materiales, se utilizaron ratones BALB/c de 6 semanas de edad.

El protocolo utilizado fue el mismo que en el apartado anterior, excepto que antes de aplicar el antiséptico se afeitó la zona donde se iba a colocar el implante y que el biomaterial implantado no estaba sembrado con ningún tipo celular.

5.2. Modelo de lesión ósea

5.2.1. Seguimiento de células sembradas en biomateriales

Con la finalidad de monitorizar las células sembradas en biomateriales implantados en una lesión ósea se realizaron lesiones en el hueso de la bóveda craneal de ratones BALB/c nu/nu de 12 semanas de edad, ya a partir de las 8 semanas las lesiones de profundidad total producidas en el cráneo no se regeneran espontáneamente¹⁵².

Protocolo:

- Se anestesiaron los animales, mediante una inyección IP, con 100 mg/kg de ketamina (Merial) y 3,3 mg/Kg de xilacina (Henry Schein).
- Se administró analgesia, mediante una inyección SC con 0,05 mg/kg de buprenorfina (Schering-Plough) antes de la operación y cada 12 horas durante las 48 horas siguientes a la operación.
- Se inmovilizaron los animales boca abajo y se aplicó un antiséptico (povidone-iodine, Braun) en la zona superior de la cabeza.
- Se realizó una incisión en la piel, justo antes de la base externa de los oídos, de extremo a extremo de la cabeza.

- Se cortó el periostio con unas tijeras y se dejó expuesto el hueso de la bóveda craneal.
- Se realizaron uno o dos defectos de 5 mm de diámetro en el hueso de la bóveda craneal con una broca esterilizada acoplada a un taladro (Dremel, Racine, EEUU). A medida que realizaba la lesión se iba limpiando con suero fisiológico frío (Braun). Se taladró el hueso hasta llegar a la duramadre sin lesionarla.
- Se rellenó el defecto con el material sembrado con células.
- Se aseguró el material en la lesión aplicando una pequeña cantidad de cola quirúrgica (Glubran2, GEM, Viareggio, Italia) alrededor del implante.
- Se cosió la piel con suturas de seda trenzada 5-0 Mersilk (Ethicon).

Los controles consistieron en dejar el defecto vacío para observar la regeneración llevada a cabo por el propio animal, o bien rellenar el defecto con el material sin sembrar para ver el efecto del material por si solo.

5.2.2. Comportamiento de las células del huésped

Para evaluar el papel de las células del huésped en la regeneración de una lesión ósea en la que se ha colocado un implante, se utilizaron ratones C57BL/6 transgénicos para la expresión de GFP de 6 semanas.

El protocolo utilizado fue el mismo que en el apartado anterior, excepto que antes de aplicar el antiséptico se eliminó el pelo de la zona superior de la cabeza y que el biomaterial implantado no estaba sembrado con ningún tipo celular.

5.2.2.1. Generación de la colonia de ratones C57BL/6 transgénicos

Con este propósito se cruzaron 3 machos C57BL/6 transgénicos heterocigotos para la expresión de GFP (cedidos por el Dr. Okabe, Osaka University, Osaka, Japón) con 10 hembras C57BL/6 (Charles-River), realizando cruces de dos semanas con un macho y dos hembras. Después del cruce las hembras se aislaron en jaulas diferentes. Las

crías se destetaron y se separaron según el sexo 3 semanas después de su nacimiento. Se comprobaron los animales transgénicos mediante la exposición ultravioleta con una lámpara de wood (Luxo, Oslo, Noruega).

5.3. Modelo de transformación celular

Para este modelo se usaron ratones BALB/c nu/nu de 6 semanas de edad.

Protocolo:

- Se anestesiaron los animales, mediante una inyección IP, con 100 mg/kg de ketamina (Merial) y 3,3 mg/Kg de xilacina (Henry Schein).
- Se tripsinizaron las células a testar y se resuspendieron en medio sin FBS.
- Se inyectaron $1,5 \cdot 10^5$ células en un volumen de 50 μ l en localizaciones IM y SC.

6. Bioluminiscencia no invasiva (BLI)

6.1. Metodología

Para evaluar el comportamiento de las células sembradas en biomateriales *in vivo*, se utilizó BLI. Esta técnica consiste en marcar células con el gen de la PLuc, sembrarlas en biomateriales, implantar los biomateriales sembrados en animales de experimentación y monitorizar el crecimiento celular a través de una reacción catalizada por la PLuc en la que se liberan fotones. Para que la reacción tenga lugar hay que administrar previamente el sustrato de la reacción, la luciferina, a los animales. Para realizar la BLI, se siguió el siguiente protocolo:

- Se anestesiaron los animales, mediante una inyección IP, con 100 mg/kg de ketamina (Merial) y 3,3 mg/Kg de xilacina (Henry Schein) y se inmovilizaron.
- Se inocularon 50 µl de luciferina (Promega) a 16,7 mg por ml en PBS 1X SC en la espalda o en la zona de la bóveda craneal o IM en los muslos.
- Las imágenes se realizaron inmediatamente después de la inoculación de luciferina. Se tomó una imagen del campo claro con una fuente de iluminación interna de la cámara de detección al 3% durante 125 milisegundos con un binning de 1X1.
- Con el animal en la misma posición, se tomó una imagen durante 5 minutos en oscuridad total con un binning de 8X8.
- Se realizaron imágenes los días 0, 7, 15, 30, 45 y 90 post implantación del material.

Para tomar las imágenes, los animales se situaron a una distancia de 247 mm del objetivo de la cámara (HFP-Schneider Xenon 0,95/25 mm) de detección del sistema de imagen de alta eficiencia ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japón). El diafragma del objetivo de la cámara se colocó en la posición de máxima apertura. Dicho sistema de imagen está dotado con una cámara C4742-98-LWG-MOD que lleva conectado un CCD que guarda 230.000 electrones/píxel y se encuentra a una temperatura de -80° C cuando la cámara está en funcionamiento para reducir el

ruido de fondo. El CCD responde a la luz de longitudes de onda entre los 300 y los 900 nm con un rendimiento del 90% para longitudes de onda entre los 500 y los 700 nm.

Para aumentar la sensibilidad de la detección, el ruido de la señal detectada se redujo registrando los eventos lumínicos en *arrays* de 8 X 8 píxels adyacentes (binning 8X8).

6.1.1. Imágenes adquiridas

Se dan importantes diferencias entre los datos guardados en la memoria de imagen (para cada píxel) del CCD y la manera en la cual estos datos son representados por el ordenador en pantalla (en forma de imágenes). Mientras la memoria de imagen puede guardar 65.535 niveles de eventos lumínicos correspondientes al número de eventos lumínicos captados por el CCD, las imágenes del ordenador sólo pueden mostrar 256 niveles (de gris o color) por cada píxel. Es por ello que las imágenes correspondientes a imágenes que en memoria contienen más eventos lumínicos que los niveles disponibles por el ordenador, no pueden ser representadas con exactitud. Así hay que hacer una elección entre mostrar los niveles de baja intensidad (y mostrar los de alta intensidad saturados) o mostrar diferentes niveles de alta intensidad (y no mostrar los de baja intensidad). Para las imágenes de esta tesis se decidió representar con exactitud los niveles de baja intensidad para poder detectar si había o no señal, de esta manera a partir de un cierto número de células, es decir a partir de un cierto número de eventos lumínicos, las imágenes aparecen saturadas.

6.2. Cuantificación de las imágenes y análisis

Para cuantificar y analizar los fotones detectados en las tomas de imágenes, se utilizó el software de análisis de imagen Wasabi (Hamamatsu Photonics).

Los eventos lumínicos se expresan como cuentas fotónicas (photon counts, PHCs).

Para calcular el número de PHCs de una zona de una imagen, se extrae de la memoria de la imagen el número de PHCs captados. La media del número de

PHCs/píxel es calculada automáticamente por el software (media A), también se calcula la media del número de PHCs/píxel de una zona donde no se habían implantado células (media B). Así el número neto de PHCs en el área de interés se calcula según la fórmula:

$$[(\text{media A de PHCs/píxel}) - (\text{media B de PHCs/píxel})] \times (\text{número de píxels en A})$$

A: zona de interés, donde hemos implantado las células.

B: zona sin implante.

En los experimentos realizados, se normalizaron todos los valores de PHCs respecto a los del día 0 (día de implantación) para compensar las diferencias en el sembrado de los materiales.

Los datos de los experimentos se representaron como el número de PHCs normalizados (la media de todos los ratones de la toma) respecto al tiempo desde que se inocularon las células o el implante celular.

6.3. Curvas estándar *in vivo*

Para poder relacionar el número de células transplantadas y los PHCs se realizaron curvas estándar para los diferentes tipos celulares estudiados.

Se inocularon en localizaciones SC o IM $5 \cdot 10^2$, 10^3 , $5 \cdot 10^3$, 10^4 , $5 \cdot 10^4$, 10^5 y en algunas ocasiones también 5 o $2,5 \cdot 10^5$ células resuspendidas en medio sin FBS. Inmediatamente después se inyectó la luciferina y se realizaron las imágenes.

Se calcularon los PHCs como se ha explicado anteriormente y se representaron frente al número de células inoculadas. La capacidad de producción de luz *in vivo* de los diferentes tipos celulares se determinó como la pendiente de la curva estándar al representar los PHCs respecto al número de células.

7. Tomografía axial computerizada (TAC)

7.1. Metodología

Con el fin de determinar la densidad del defecto realizado en la bóveda craneal se realizaron tomografías, mediante el tomógrafo de tercera generación TAC EXEL 2400 ELITE (Philips, Madrid, España), a todos los animales operados en el Hospital Clínic Veterinari (Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España). Las mediciones se hicieron los días 2, 47 y 92, para tener una medida de la densidad al inicio, mitad y final del experimento.

Protocolo:

- Se anestesiaron los animales, mediante una inyección IP, con 100 mg/kg de ketamina (Merial) y 3,3 mg/Kg de xilacina (Henry Schein) y se inmovilizaron boca abajo.
- Las imágenes se realizaron colocando el animal en el tomógrafo, situando la línea que marcaba el lugar de la imagen sobre la zona de la lesión.
- Se realizó una imagen de 2,5 mm sin contraste. Las condiciones de la imagen fueron: 120 kv, 315 mA/segundo, diámetro de escaneado de 240 mm, 2,1 segundos/imagen, zoom de 5,00.

7.2. Cuantificación de las imágenes y análisis

Se utilizó la ventana *spine* para visualizar las imágenes y se seleccionó la función ROI que indicaba la densidad de las diferentes zonas de la imagen. Así se calculó la densidad de los defectos tanto tratados como sin tratar. Posteriormente, se realizó la media de las medidas de densidad de todos los ratones de los cuatro grupos analizados y se representó dicha densidad media respecto al tiempo desde que se se había implantado el material sembrado con células o sin sembrar.

8. Preparación de explantes y migración celular

8.1. Obtención de los explantes

Para analizar las células C3H/10T1/2 implantadas después de la fase *in vivo*, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de los muslos donde se habían colocado los implantes.

Se aisló un músculo de cada grupo de animales (con materiales diferentes), se lavó con PBS 1X y se hicieron pequeños fragmentos del tejido muscular aislado. Los fragmentos se depositaron en placas de cultivo y se cubrieron con una fina capa de medio de crecimiento C3H/10T1/2 suplementado con 2% de P/S y 1% de anfotericina B. Al día siguiente se añadió medio fresco y se continuó el cultivo hasta que se observaron, mediante microscopía de fluorescencia, células GFP positivas migrando de los explantes. Dichas células fueron tripsinizadas, sembradas en medio fresco y expandidas hasta que hubo suficientes para hacer determinaciones de fluorescencia (mediante FACS) y de la actividad luciferasa (luminométricamente).

8.2. Migración celular. Metodología

Con la finalidad de detectar si hubo migración de las células implantadas desde el lugar donde se implantaron a otros órganos y tejidos, se siguió el siguiente protocolo:

- Se pesaron los tubos de plástico donde se depositarían los diferentes tejidos y se colocaron en hielo.
- Se sacrificaron los animales mediante dislocación cervical y se aislaron: los pulmones, el bazo, las costillas, el hígado, el cerebro y los ganglios axiales, lumbares e inguinales (juntos o por separado). Se colocaron los órganos en los tubos y se congelaron a -20° C.

- Se pesaron los tubos con el tejido congelado y se calculó el peso del tejido. Se añadieron por tubo 1 µl de RLB 1X por mg de tejido, manteniendo los tubos en hielo. En el caso de los ganglios se añadió RLB 1X con albúmina (Sigma) al 10%.
- Se limpió el homogeneizador ULTRA – TURRAX T- 25 (IKA Werke, Staufen, Alemania) haciendo varios pulsos con etanol al 70% y agua destilada.
- Se trituró el tejido, en hielo, con el homogeneizador a una velocidad de 16000 rpm haciendo pulsos de 10 segundos.
- Se centrifugó el tejido homogeneizado a 12000 rpm y 4° C durante 50 minutos.
- Se recogió el sobrenadante obtenido y se mantuvo en hielo. Si el sobrenadante estaba todavía turbio se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones durante 15 minutos.
- Se mezclaron 20 µl del sobrenadante con 100 µl de luciferina y se midió la producción de luz en un luminómetro durante un tiempo de 10 segundos.

8.2.1. Cálculo del número de células en los órganos/tejidos

Si la lectura de los sobrenadantes de los lisados, obtenida con el luminómetro, era superior al blanco (20 µl de RLB 1X o RLB 1X al 10% de albúmina con 100 µl de luciferina) se procedía al cálculo de las células presentes en el tejido en cuestión.

Para el cálculo de las RLUs totales en el tejido, se tuvo en cuenta que las RLUs obtenidas en el luminómetro se referían a 20 µl y que el volumen total del tejido /órgano era el doble del volumen añadido para homogeneizar (ya que el volumen añadido era igual al peso del tejido). Las RLUs totales obtenidas se ajustaron según el factor de apantallamiento de cada órgano o tejido, es decir, se corrigieron según el porcentaje de luz que queda absorbida en cada tejido.

9. Técnicas histológicas

9.1. Muestras de diferenciaciones *in vitro*

Con el fin de poner de manifiesto el resultado de las diferenciaciones *in vitro* (apartado 2) a cartílago, hueso y tejido adiposo, se lavaron las células con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 4% al menos durante una hora y media. Después se lavaron con PBS 1X y se realizó la tinción específica.

En el caso de la diferenciación a cartílago con microprecipitado, el día 21 se lavaron los microprecipitados en PBS 1X y se dejaron 24 horas con PFA al 4%. Al día siguiente se lavaron en PBS 1X y se incluyeron en 50µl de agarosa low melting (FMC BioProducts, Rockland, EEUU) al 1,5% en PBS 1X. Una vez solidificada la agarosa, los bloques se incluyeron en parafina usando un procesador de tejidos (Shandon Citadle 2000, Thermo Scientific, Waltham, EEUU) y luego se hicieron bloques de parafina usando un dispensador de parafina (EG1150H, Leica). Se hicieron cortes de 5 µm de los bloques previamente preparados con un micrótomo (Jung RM2055, Leica) y los cortes se pusieron unos segundos en un baño (HI1210, Leica) y luego se dejaron secar sobre portas (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania) silanizados*. Una vez secos los portas, se realizaron las tinciones específicas.

* Silanización de portas:

- Se limpiaron los portas con etanol al 70% y se secaron.
- Se mantuvieron los portas durante 4 minutos en una mezcla de (3-Aminopropil)triethoxy-silane (Sigma) y acetona (Panreac, Castellar del Vallès, España), 10 ml de silane y 240 ml de acetona.
- Se realizaron dos lavados de 4 minutos en acetona.
- Se realizaron dos lavados de 4 minutos en agua destilada.
- Se dejaron secar a temperatura ambiente y después se mantuvieron 12 horas a 37°

C.

9.1.1. Tinción de Von Kossa para hueso sobre células en placa

Esta tinción se basa en la sustitución de los iones de calcio intratisulares en forma de fosfatos o carbonatos, por iones de plata en solución acuosa sometidos a un proceso de exposición a la luz. Los depósitos iniciales de calcio se colorean de marrón-negro¹⁵³.

Después de que las células fueran fijadas y lavadas se siguió el siguiente protocolo:

- Se lavaron las células con agua destilada durante 5 minutos dos veces.
- Se incubaron durante 1 hora con nitrato de plata (Sigma) al 2% en agua destilada bajo una fuente de luz de 70 W.
- Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos 2 veces.
- Se incubaron con tiosulfato de sodio (Panreac) al 5% en agua destilada durante 5 minutos, para parar la reacción del nitrato de plata.
- Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.
- Se contra-tiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 2-3 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.

9.1.2. Tinción de Rojo de Alizarina S para hueso sobre células en placa

Esta técnica se fundamenta en la formación de complejos poco solubles y coloreados entre algunos colorantes, como el rojo de alizarina S, y metales en estado iónico como el calcio. En este proceso, el pH de la solución colorante es crítico para asegurar la identificación positiva de las sales de calcio, y debe encontrarse entre 4,1 y 4,3¹⁵³.

Después de que las células fueran fijadas y lavadas se siguió el siguiente protocolo:

- Se lavaron las células con agua destilada durante 5 minutos dos veces.
- Se tiñeron con una solución de rojo de alizarina S (Ferosa, Barcelona, España), al 2% en agua destilada y un pH de 4,1 – 4,3, durante 2 - 4 minutos.

- Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos 3 veces.
- Se contra-tiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 2 - 3 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.

9.1.3. Tinción de oil red O para lípidos sobre células en placa

El oil red O es un lisocromo, un colorante neutro que tiñe específicamente los lípidos, muy soluble en lípidos neutros (triglicéridos). Debido a sus características de solubilidad se une a los triglicéridos y a algunas proteínas ligadas a lípidos, dándoles una coloración rojiza.

Después de que las células fueran fijadas y lavadas se siguió el siguiente protocolo:

- Se lavaron las células con isopropanol (Panreac) al 60% durante 1 minuto.
- Se tiñeron con solución de trabajo Oil Red O * (Sigma) durante 5 minutos.
- Se lavaron con isopropanol al 60% durante 1 minuto dos veces.
- Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.
- Se contra-tiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 2 - 3 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.

* Solución stock: solución saturada de Oil Red O en isopropanol al 100%.

Solución de trabajo: 60 ml de solución stock y 40 ml de agua destilada.

9.1.4. Tinción de Azul de Alcían para cartílago sobre células en placa

El azul alcían está compuesto por un átomo de cobre central rodeado de cuatro anillos aromáticos nitrogenados. Al ser una sustancia básica, se une a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos dando lugar a la formación de un compuesto salino de color azul, cuando el nivel de pH es suficientemente bajo¹⁵³.

Después de que las células fueran fijadas y lavadas se siguió el siguiente protocolo:

- Se lavaron las células con agua destilada durante 5 minutos dos veces.
- Se lavaron con ácido clorhídrico a 0,1 mol/l.
- Se tiñeron con solución de azul alcian (Fluka) al 1% (2 gr de azul alcian, 97 ml de agua destilada y 100 ml de ácido acético glacial) y pH 1 durante una hora y media.
- Se lavaron con ácido clorhídrico a 0,1 mol/l durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se contra-tiñeron con nuclear fast red solution (Sigma) entre 5 y 10 minutos.
- Se lavaron con agua destilada.

9.1.5. Tinción de Azul de Toluidina para cartílago sobre cortes

Esta técnica se basa en el mismo principio que la técnica del azul alcian.

Después de obtener los cortes de los bloques de parafina que contenían los microprecipitados se siguió el siguiente protocolo de tinción:

- Se dejaron los portas con los cortes a 50° C durante 2 horas.
- Se desparafinaron en xilol entre 10 y 15 minutos.
- Se rehidrataron:
 - 3 minutos en etanol absoluto dos veces
 - 3 minutos en etanol al 95% dos veces
 - 3 minutos en etanol al 70% dos veces
 - 5 minutos en agua destilada
- Se tiñeron con azul de toluidina (Sigma) al 1% (1gr de azul de toluidina, 20 ml de etanol al 96%, 80 ml de agua destilada y 1 ml de ácido acético glacial) durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua destilada y posteriormente con dioxano (Fluka).
- Se lavaron con etanol al 96%.
- Se deshidrataron con etanol al 95% durante 2 minutos y posteriormente con etanol absoluto durante 2 minutos.

- Se lavaron con xilol durante 5 minutos.
- Se montaron con histomount (National Diagnostics, Atlanta, EEUU).

9.2. Muestras de animales

Dependiendo del experimento se aislaron muestras musculares, subcutáneas y óseas, donde se habían implantado materiales sembrados con células o sin sembrar.

9.2.1. Inclusión en OCT y preparación de bloques y cortes

Se incluyeron en OCT (tissue-tek, Sakura, Zoeterwoude, Holanda) muestras musculares donde habían sido implantados materiales sembrados con células C3H/10T1/2, según el siguiente protocolo:

- Se sacrificaron los animales por dislocación cervical.
- Se realizó una incisión en la piel, se retiró y se diseccionó el muslo del hueso.
- Se colocó un soporte plano de metal sobre nieve carbónica y sobre él pequeños soportes de plástico para incluir las muestras.
- Se colocó un poco de OCT en el soporte de plástico e inmediatamente después se colocó la muestra en el soporte. Se cubrió la muestra con OCT.
- Se dejaron los bloques de OCT a -20° C hasta realizar los cortes.
- Se realizaron cortes de 5 µm con un criostato (Jung CM3000, Leica).

9.2.2. Inclusión en parafina

Se incluyeron en parafina muestras musculares, subcutáneas y del hueso de la bóveda craneal según el siguiente protocolo:

- Se sacrificaron los animales por dislocación cervical.
- Se realizó una incisión en la piel, se retiró y se diseccionó el músculo, el hueso o el implante subcutáneo.

- Se lavaron las muestras en PBS 1X y se mantuvieron en PFA al 4% a 4° C al menos 24 horas.
- Se decalcificaron las muestras si era necesario.
- Se lavaron en PBS 1X.
- Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos como se ha explicado anteriormente para los bloques de agarosa de los microprecipitados.

9.2.2.1. Decalcificación

Las muestras musculares se decalcificaron suavemente por si habían quedado restos óseos según el siguiente protocolo:

- Se colocó en un vaso de precipitados un 20% del volumen del recipiente de resina de intercambio iónico (Amberlite, Sigma) y sobre ella una gasa. Se colocó sobre la gasa la muestra a decalcificar.
- Se cubrió la muestra con ácido fórmico (Sigma) al 10% en agua destilada y se dejó a temperatura ambiente.
- Se revisó diariamente la consistencia de la muestra y se mantuvo en ácido fórmico hasta que perdió su dureza, generalmente entre 24 - 48 horas fueron suficientes.
- Se lavó con PBS 1X antes de incluir las muestras en parafina.

Las muestras óseas de la bóveda craneal se decalcificaron con TBD-2 (Thermo) según el siguiente protocolo:

- Se lavaron brevemente las muestras en PBS 1X y se depositaron en un vaso de precipitados de vidrio o plástico.
- Se añadió al vaso de precipitados un volumen de TBD-2 igual a 20 veces el volumen de la muestra y se dejó a temperatura ambiente con agitación durante 24 horas.
- Se lavó con PBS 1X antes de incluir las muestras en parafina.

9.2.3. Tinciones histológicas básicas

Los portas con cortes de OCT se tuvieron 1 hora a 37° C antes de teñir, luego se fijaron con acetona absoluta a 4° C durante 5 minutos y se dejaron secar al aire.

9.2.3.1. Hematoxilina-eosina (HE)

Esta técnica se utilizó sobre secciones de implantes IM y SC embebidos en parafina o bien incluidos en OCT.

Esta tinción consta de una fase en la que se colorean los núcleos con hematoxilina y otra fase de contraste citoplasmático y de los componentes extracelulares coloreados con eosina. La hematoxilina es un colorante natural básico muy selectivo para colorear la cromatina nuclear. La eosina, un colorante ácido que contiene dos (eosina B) o cuatro (eosina Y) átomos de bromo, se difunde fácilmente en los tejidos y debido a su carácter ácido se une y tiñe las proteínas tisulares al ser atraída hacia los radicales básicos de determinados aminoácidos¹⁵³.

Protocolo de tinción:

- Se lavaron los portas con cortes de OCT en agua destilada durante 5 minutos.
- Se desparafinaron y se rehidrataron los portas con cortes de parafina como se ha explicado anteriormente.
- Se tiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.
- Se tiñeron con eosina durante 20 segundos. La eosina se preparó mezclando 0,5 g de eosina B (Serva, Heidelberg, Alemania) y 1,5 g de eosina Y (Serva) en 500 ml de etanol al 96%.
- Se deshidrataron y se montaron como se ha explicado anteriormente.

9.2.3.2. Tricrómico de Masson

Esta técnica se utilizó sobre secciones de implantes intramusculares embebidos en parafina. Mediante esta tinción se tiñen de forma diferencial los núcleos celulares, el tejido epitelial y el tejido conjuntivo. Sin embargo, en esta tesis, esta tinción se utilizó por su capacidad para eliminar la auto-fluorescencia del tejido muscular, debida sobretudo al colágeno. La auto-fluorescencia se elimina al quedar teñidas las fibras de colágeno, lo cual se debe en gran medida a la acción del ácido fosfomolibdico.

Protocolo de tinción:

- Se desparafinaron y se rehidrataron los portas con cortes de parafina como se ha explicado anteriormente.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se tiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua acética (1 ml de ácido acético y 99 ml de agua destilada) durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se tiñeron con fucsina de ponceau durante 5 minutos. Esta fucsina se realizó con las soluciones:
 - A: 1 g de silidina de ponceau (Sigma) en 100 ml de agua acética al 0,5%.
 - B: 1 g de fuccina ácida (Sigma) en 100 ml de agua acética al 0,5%.Se mezclaron 2 partes de la solución A y una parte de la solución B para obtener la fuccina de ponceau.
- Se lavaron con agua corriente durante 1 minuto.
- Se lavaron con agua acética durante 1 minuto.
- Se trataron con ácido fosfomolibdico (1 g en 100 ml de agua destilada) durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua acética durante 1 minuto.

- Se tñieron con azul de anilina durante 5 minutos. Para obtener el azul de anilina, se preparó una solución saturada de azul de anilina (Sigma) en ácido acético al 2,5%. Posteriormente, se mezclaron 2,5 ml de dicha solución saturada con 97,5 ml de agua destilada.
- Se lavaron con agua corriente durante 1 minuto.
- Se lavaron con agua acética durante 1 minuto.
- Se lavaron con agua corriente durante 1 minuto.
- Se deshidrataron y se montaron como se ha explicado anteriormente.

9.2.4. Tinciones de inmunohistoquímica

9.2.4.1. Tinción de detección de biotina

Esta tinción se utilizó para poder detectar el material RAD16-Ib sobre secciones de implantes musculares del material embebido en parafina, ya que el hidrogel es transparente. La detección de la biotina se basa en la fuerte e irreversible reacción que tiene lugar entre las moléculas de avidina y biotina, en este caso la avidina estaba conjugada con peroxidasa. Posteriormente se detectó la peroxidasa añadiendo el sustrato de ésta, la diamiobenzidina (DAB).

Protocolo de tinción:

- Se desparafinaron y se rehidrataron los portas con cortes de parafina como se ha explicado anteriormente.
- Se preparó el reactivo ABC (Vector Labs, London, Inglaterra):
 - Se añadió a 2,5 ml de PBS 1X una gota de la solución A y se vortexó.
 - Se añadió a la mezcla anterior una gota de la solución B y se vortexó.
 - Se mantuvo la mezcla final inmóvil y protegida de la luz durante un mínimo de 30 minutos.
- Se permeabilizaron las muestras con PBS-Tween al 0,1% durante 10 minutos.
- Se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos, tres veces.

- Se trataron con el reactivo ABC preparado, durante 30 minutos en total oscuridad.
- Se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos, tres veces.
- Se reveló la tinción con diamiobenzidina (DAB, Vector Labs) diluida 1:10 en el sustrato DAB durante 1 - 5 minutos.
- Se lavaron los portas con agua corriente.
- Se lavaron con agua destilada.
- Se contra-tiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 2 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua destilada.
- Se deshidrataron y se montaron como se ha explicado anteriormente.

9.2.4.2. Tinción de detección de EGFP

Esta técnica se realizó para detectar las células sembradas en los materiales implantados en los ratones, a través de la detección de la proteína EGFP. Se utilizaron secciones de implantes colocados en el hueso de la bóveda craneal embebidos en parafina.

Protocolo de tinción:

- Se colocaron los portas en una cámara húmeda y se realizaron dos lavados de 10 minutos con PBS 1X.
- Se bloquearon con una solución de 45 ml de metanol (Panreac) y 5 ml de agua oxigenada durante 30 minutos.
- Se permeabilizaron con PBS - Tween al 1% durante 5 minutos.
- Se bloquearon con PBS – BSA 2% - Tween 0,1% durante 30 minutos.
- Se añadió el anticuerpo primario: goat polyclonal anti eGFP (Abcam, Cambrigde, Inglaterra).
 - Control: PBS – BSA 1% - Tween 0,1%
 - Muestra: PBS – BSA 1% - Tween 0,1% con el anticuerpo primario a una dilución final de 1:100.

Se colocaron 200 μ l encima de los portas, se cubrieron con parafilm y se dejaron a 37° C con agitación suave durante 2 horas.

- Se lavaron los portas con PBS – Tween 0,1% durante 5 minutos cuatro veces.
- Se añadió el anticuerpo secundario: rabbit polyclonal anti goat IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Abcam). Se realizó una dilución del anticuerpo al 1:200 en PBS – BSA 1% - Tween 0,1% y se colocaron 200 μ l en cada porta. Se cubrieron con parafilm y se dejaron a 37° C con agitación suave durante 1 hora.
- Se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos cuatro veces.
- Se reveló la tinción con DAB diluida al 1:10 en sustrato DAB durante 1 - 5 minutos.
- Se lavaron los portas con agua corriente.
- Se lavaron con agua destilada.
- Se contra-tiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 2 minutos.
- Se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua destilada.
- Se deshidrataron y se montaron como se ha explicado anteriormente.

“Huye de esos estudios cuyo resultado muere con el que los hace”

Leonardo da Vinci.

Resultados

En los últimos años se ha desarrollado un gran número de materiales para regenerar diferentes tejidos. La mayoría tiene un buen comportamiento *in vitro*, potenciando el crecimiento y la diferenciación de las células sembradas en ellos. Sin embargo, las observaciones *in vitro* no son un indicador fiable del comportamiento *in vivo* de combinaciones de materiales y células. Por esta razón, se quisieron estandarizar modelos *in vivo*, basados en técnicas de bioluminiscencia, para evaluar el comportamiento de biomateriales sembrados con células progenitoras de una forma no invasiva.

En este apartado, organizado en tres capítulos, se detallan los resultados obtenidos utilizando dos modelos *in vivo*. En el primer capítulo, se muestra un modelo ectópico que permite seleccionar un determinado biomaterial en función de su capacidad para potenciar la proliferación de las células sembradas. En el segundo capítulo, se expone un modelo de regeneración ósea con el que se evalúa la capacidad de proliferación y diferenciación de diferentes tipos celulares en un tejido concreto. En el tercer capítulo, se describe una combinación concreta de un biomaterial y un tipo celular que lleva a la formación de tumores al implantarse ectópicamente.

Capítulo I

Modelo de análisis del comportamiento de combinaciones
de células progenitoras y materiales *in vivo*.

1. Análisis del comportamiento de las células C3H/10T1/2 sembradas en biomateriales

1.2. Caracterización de las células C3H/10T1/2

Este tipo celular ya descrito en la sección de materiales y métodos se utilizó como modelo de MSCs para seleccionar *in vivo* el material que mejor permitiera su crecimiento. Para verificar que poseían la capacidad de diferenciarse a diferentes linajes, característicos de las MSCs⁶², se indujo su diferenciación *in vitro* a hueso, cartilago y tejido adiposo mediante el tratamiento con medios específicos de diferenciación. La diferenciación de las células C3H/10T1/2 a los diferentes linajes se puso de manifiesto mediante tinciones histológicas específicas de cada tejido (Fig. 40).

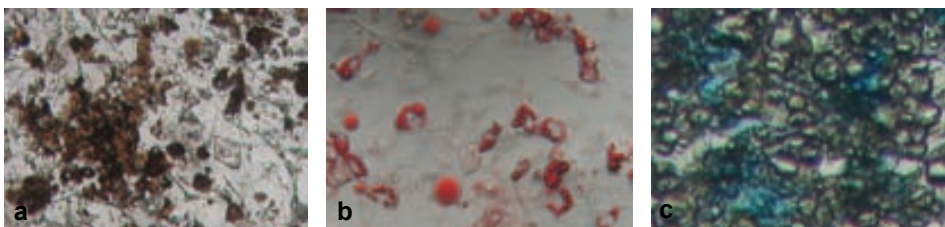


Fig. 40. Tinciones histológicas de Von Kossa (a), oil Red O (b) y azul alcian (c) sobre células C3H/10T1/2 tratadas con medios de diferenciación específicos. Objetivo (20X/0,5)

Así, el tratamiento de las células con medio osteogénico, indujo la deposición de sales de calcio. En la tinción de Von Kossa, los iones de calcio en forma de fosfatos o carbonatos son sustituidos por iones de plata que al ser expuestos a la luz, se reducen a plata metálica que forma un depósito de tonalidad marrón-negra (Fig. 40 a). En medio adipogénico, las células diferenciadas a adipocitos, acumularon vacuolas de lípidos que se tiñeron con oil red O de color rojo (Fig. 40 b). Finalmente, las células mantenidas en medio condriogénico sintetizaron matriz extracelular rica en

proteoglicanos ácidos que fueron detectados mediante la tinción con azul alcian, en la cual a un pH específico, este tipo de proteoglicanos se tiñen de color azul (Fig. 40 c).

1.2. Producción de luz de las células C3H/10T1/2

1.2.1. Producción de luz *in vitro*

Una vez verificada la capacidad de diferenciación de esta línea celular, se marcaron las células con vectores retrovíricos para la expresión constitutiva de las proteínas trazadoras EGFP y PLuc. Después del marcaje, se seleccionó el 7% de células más fluorescente (G-Luc-C3H/10T1/2) mediante FACS y se expandió el cultivo de células *in vitro*.

Para determinar la cantidad de luz generada por las células G-Luc-C3H/10T1/2 en cultivo, se midió la actividad de luciferasa en lisados celulares utilizando un luminómetro. La figura 41 muestra la curva estándar de producción de luz expresada como RLUs frente al número de células presentes en los lisados.

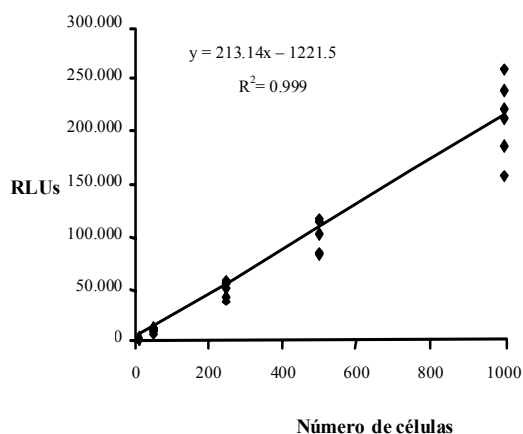


Fig. 41. Luminiscencia *in vitro* de las células G-Luc-C3H/10T1/2. La gráfica muestra la capacidad de producción de luz de 10, 50, 250, 500 y 1000 células. R = coeficiente de correlación.

La pendiente de la recta de regresión, es decir, el número de RLUs producidas por una célula G-Luc-C3H/10T1/2 fue de 213 RLUs/célula.

1.2.2. Producción de luz *in vivo*

Con el fin de determinar la capacidad de detección de las células *in vivo* y el efecto atenuante de los tejidos, se inyectaron $5 \cdot 10^2$, 10^3 , $5 \cdot 10^3$, 10^4 , $5 \cdot 10^4$, 10^5 y $5 \cdot 10^5$ células G·Luc-C3H/10T1/2 en los muslos de ratones BALB/c nu/nu y se tomaron imágenes después de la administración SC *in situ* de luciferina. Se utilizó esta vía de administración del sustrato para incrementar la sensibilidad de la detección.

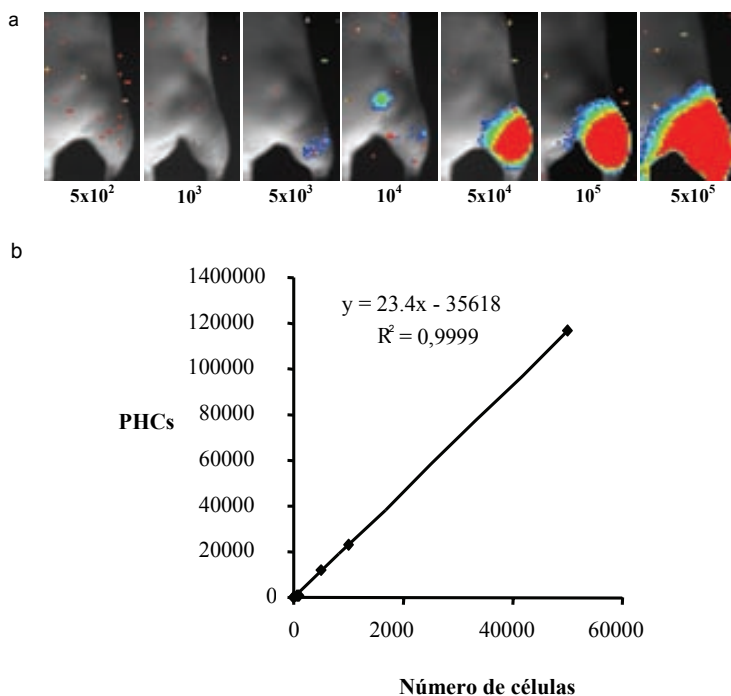


Fig. 42. Detección de las G·Luc-C3H/10T1/2 *in vivo*. Imágenes tomadas inmediatamente después de la inoculación de las células y la administración de luciferina (a). Curva estándar de los PHCs detectados respecto al número de células inyectadas (b). R = coeficiente de correlación.

El número de PHCs detectados, extraído de las imágenes registradas (Fig. 42 a) se representó frente al número de células inoculadas (Fig. 42 b), una vez se hubo sustraído el ruido de fondo correspondiente a una área de la imagen donde no se habían inyectado células.

Los datos muestran que se requiere un mínimo de 5.000 células G·Luc-C3H/10T1/2 para poder detectar la señal de bioluminiscencia en los ratones. Además la relación

lineal observada entre el número de células inyectadas y los PHCs registrados indica que se puede cuantificar el número de células y que el tejido tiene un efecto lineal en el apantallamiento de los fotones transmitidos. La pendiente de la recta de regresión indica que el número de PHCs detectados no invasivamente/célula fue de 23,4.

1.3. Proliferación de las células G-Luc-C3H/10T1/2 *in vitro*

Para determinar la capacidad de los diferentes materiales para sostener la proliferación celular, se sembraron las células G-Luc-C3H/10T1/2 en diferentes tipos de materiales: hidrogeles de gelatina-glutaraldehído, hidrogeles de PEG, hidrogeles de PEG-RGD, esferas de alginato, esferas Cytodex™ 3, esferas PAMs y soportes de quitosano.

Una parte de cada material se implantó en localizaciones SC e IM, en ratones BALB/c nu/nu, como ya se ha descrito en materiales y métodos y la otra parte se mantuvo *in vitro* para observar el crecimiento celular y el comportamiento del material.

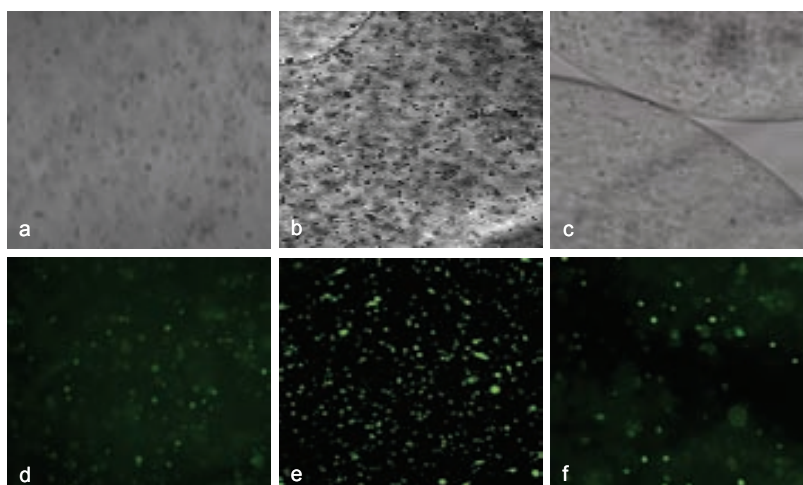


Fig. 43. Microfotografías de células G.Luc-C3H/10T1/2 sembradas en los biomateriales. Hidrogel de PEG (a,d), hidrogel de PEG-RGD (b,e) y esferas de alginato (c,f). Imágenes obtenidas con un microscopio de contraste de fase (a, c, d, f) (objetivo: 20X/0,4) con (d, f) o sin fluorescencia (a, c). Imágenes obtenidas con un microscopio confocal (b, e) (objetivo 63X/1,3) con (e) o sin fluorescencia (b).

Se observó que la morfología de las células dependió del material en que se sembraron. Así mientras las células sembradas en el hidrogel de PEG, el hidrogel de PEG-RGD y las esferas de alginato mantuvieron una morfología esférica (Fig. 43), las que se sembraron en el hidrogel de gelatina-glutaraldehído, el soporte de quitosano, las esferas PAMs y las esferas Cytodex™ 3 adoptaron una morfología fibrobástica a las pocas horas de la siembra (Fig. 44).

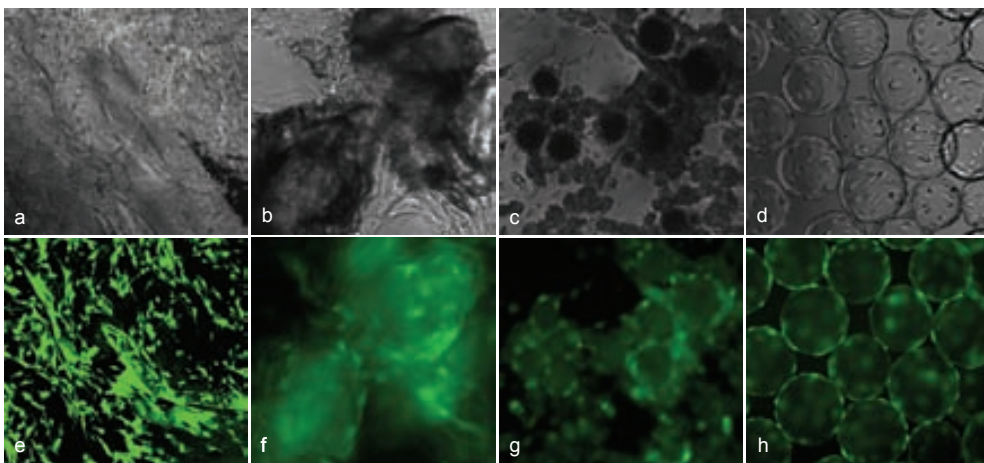


Fig. 44. Microfotografías de células G.Luc-C3H/10T1/2 sembradas en biomateriales. G.Luc-C3H/10T1/2 sembradas en un hidrogel de gelatina-glutaraldehído (a, e), en un soporte de quitosano (b, f), en esferas PAMs (c, g) y en esferas Cytodex™ 3 (d, h). Imágenes obtenidas con un microscopio de contraste de fase (b-d, f-h) (objetivo: 20X/0,4) con (f-h) o sin fluorescencia (b-d). Imágenes obtenidas con un microscopio confocal (a, e) (objetivo 63X/1,3) con (e) o sin fluorescencia (a).

El comportamiento de los materiales *in vitro* no fue el mismo en todos los casos. La mayoría de materiales mantuvieron su estructura durante 4 meses en cultivo, excepto el hidrogel de gelatina-glutaraldehído que se disolvió en 8 semanas y el hidrogel de PEG que se degradó en una semana.

1.4. Proliferación de las células G-Luc-C3H/10T1/2 *in vivo*

La capacidad de los diferentes materiales para mantener la proliferación de las células G-Luc-C3H/10T1/2 *in vivo*, en los dos ambientes fisiológicos (SC e IM), fue analizada mediante imágenes de BLI de los materiales sembrados con dichas células e implantados en ratones BALBc nu/nu. La figura 45 muestra las imágenes más representativas de cada material a lo largo del experimento. Los datos cuantitativos de la proliferación celular, obtenidos de los PHCs extraídos de las imágenes, están gráficamente representados en la figura 46.

Las imágenes y los correspondientes datos cuantitativos extraídos de ellas, muestran que las células G-Luc-C3H/10T1/2 sembradas en los materiales son fácilmente detectables *in vivo* tanto en las localizaciones SC como en las IM hasta 3 meses después de su implantación.

Se observó una clara preferencia a la proliferación de las células G-Luc-C3H/10T1/2 en los implantes IM en comparación con los implantes SC para la mayoría de los materiales probados. En los implantes SC, tanto las células sembradas en materiales como las células inyectadas sin soporte, fueron generalmente incapaces de proliferar y la mayoría desaparecieron, sólo en 4 de las 48 implantaciones SC se detectaron células al final de los 3 meses de experimento. Por el contrario, las células implantadas IM mostraron una mayor capacidad de supervivencia y al final del período de implantación se detectaron células en 22 de las 48 implantaciones.

Se observó una fase de crisis del crecimiento durante la primera semana, para las células inyectadas sin soporte y las células sembradas en algunos materiales (hidrogel PEG-RGD, esferas CytodexTM 3 e hidrogel de gelatina-glutaraldehído), seguida de una fase de recuperación.

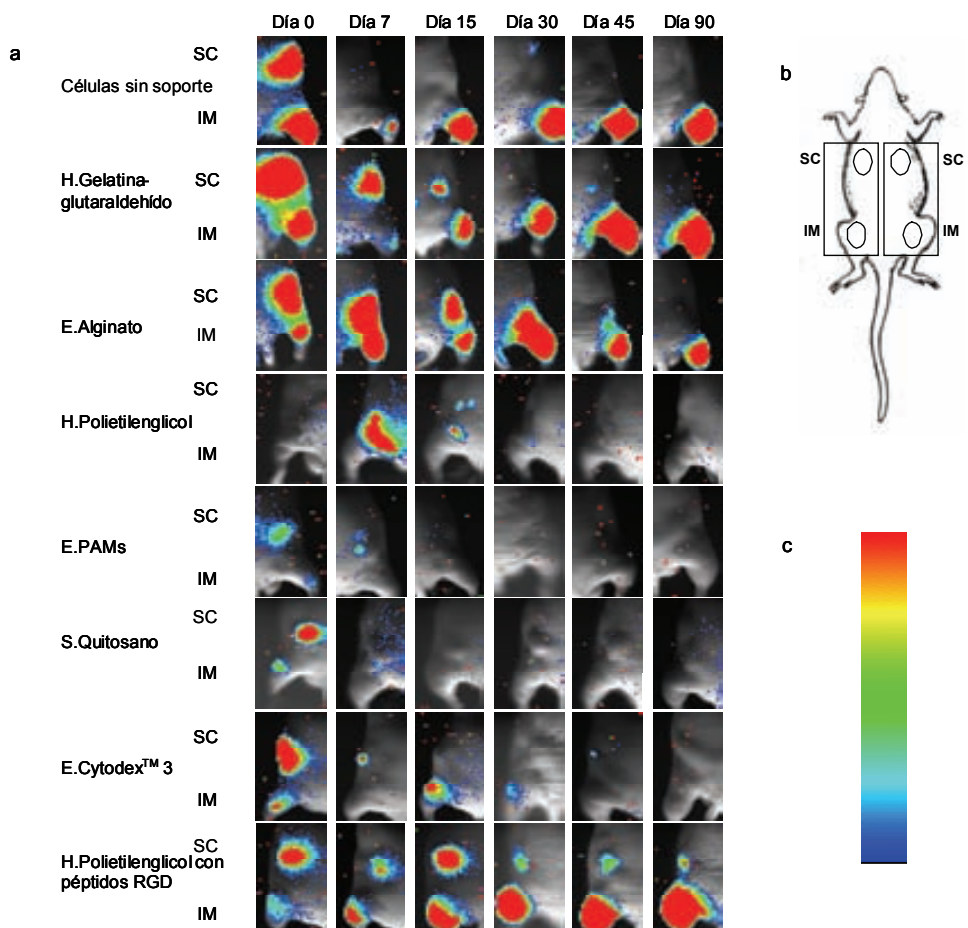


Fig. 45. Proliferación de las células G:Luc-C3H/10T1/2 implantadas en ratones BALB/c nu/nu. Imágenes de los fotones emitidos por las células implantadas (color) en localizaciones IM y SC superpuestas sobre las imágenes del campo claro del ratón los días 0,7,12,30,45 y 90 post implantación (a). Diagrama de la ubicación de los implantes en los ratones (b). Escala de color estándar de la intensidad de la luz emitida por las células (c) (máxima intensidad=rojo; mínimo=azul).

Los materiales implantados IM mostraron diferentes capacidades para soportar la proliferación de las células sembradas. Así la comparación de la luz producida por las células implantadas en los 90 días mostró que el número de células inyectadas sin soporte, tras la crisis inicial de crecimiento, tendió a mantenerse constante. Las células sembradas en el hidrogel de gelatina-glutaraldehído y en las esferas de alginato tuvieron un comportamiento parecido al de las células inyectadas sin soporte. Las

células sembradas en el hidrogel de PEG y en las esferas PAMs dejaron de proliferar y sólo se pudieron detectar células en algún ratón de estos grupos hasta la mitad del experimento, sobre el día 45. Las células sembradas en el soporte de quitosano, no pudieron ser detectadas a partir del día 15.

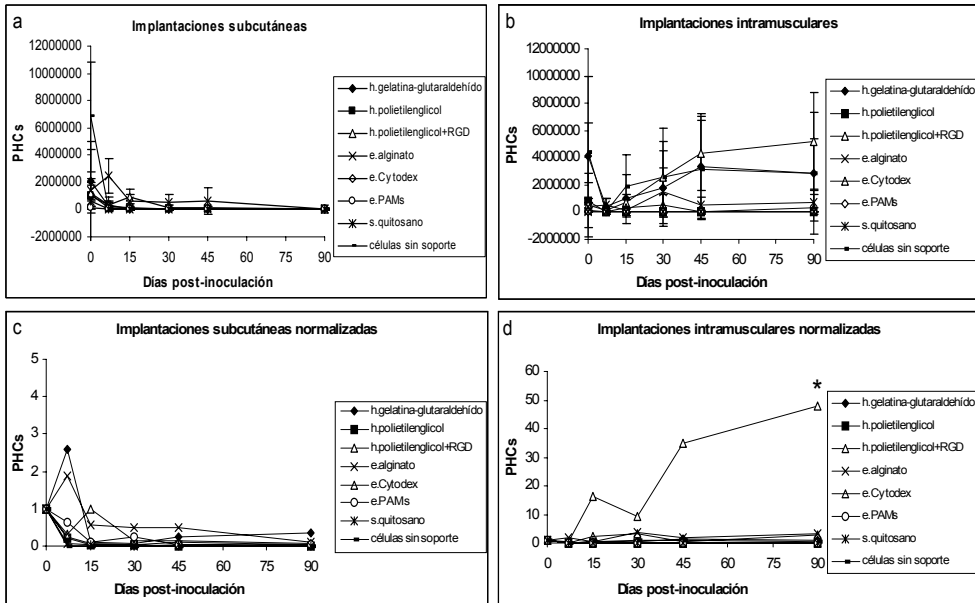


Fig. 46. Análisis cuantitativo de los PHCs detectados en las imágenes. Después de la sustracción del ruido de fondo de todas las implantaciones SC (a) e IM (b), los PHCs se representaron frente al tiempo post-inoculación. Para compensar las diferencias en el sembrado de los materiales, los PHCs se representan también normalizados respecto a los PHCs del día 0 (c, d). Los diferentes símbolos representan las medias de cada grupo en los tiempos de medición. Las barras representan la desviación estándar. El asterisco representa las diferencias estadísticamente significativas.

Aunque las células sembradas en esferas de CytodexTM 3, aparentemente parecieron proliferar más que los controles sin soporte, esto sólo se observó en dos de los seis ratones del grupo. Finalmente, las células sembradas en el hidrogel de PEG-RGD fueron detectadas en todos los ratones del grupo a los 90 días y proliferaron hasta producir en promedio 40 veces más luz que en el momento de la implantación. Esta diferencia en la proliferación celular de las células sembradas en el hidrogel de PEG-RGD respecto a los otros materiales fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Además, las células implantadas SC en este material fueron detectadas en 3 de los 6 ratones del grupo al final del experimento, y en estos casos los materiales estaban muy vascularizados.

1.5. Migración de las células implantadas

Aunque no se detectó en las imágenes, las células G-Luc-C3H/10T1/2 sembradas en los materiales, podrían haber emigrado desde los lugares de implantación y colonizado otros órganos. Sin embargo, el análisis luminométrico de la actividad luciferasa en homogeneizados de tejido de cerebro, hígado, bazo, pulmones, hueso y ganglios linfáticos, un procedimiento más sensible que la BLI, no demostró la presencia de células. El límite inferior de detección del procedimiento es de 10 células en los ganglios linfáticos y de entre 50 y 100 células en el resto de los órganos utilizados.

1.6. Examen macro y microscópico de la zona de implantación

A lo largo del experimento no se detectó ninguna alteración en los animales excepto en aquellos en los que se implantó el soporte de quitosano. El 100% de estos ratones expulsaron el material implantado SC y un 30% expulsaron el material implantado IM. Tras la expulsión del material el tejido cicatrizó espontáneamente.

A los 90 días de implantación se sacrificaron los animales y se analizó el lugar de implantación. Aunque no se detectó evidencia de inflamación macroscópicamente, en la mayoría de las secciones histológicas analizadas se observó infiltración de linfocitos (Fig. 47) en los lugares en que se habían implantado materiales sembrados con células. No se detectó infiltración de linfocitos en los animales en los que se habían inyectado células sin soporte.

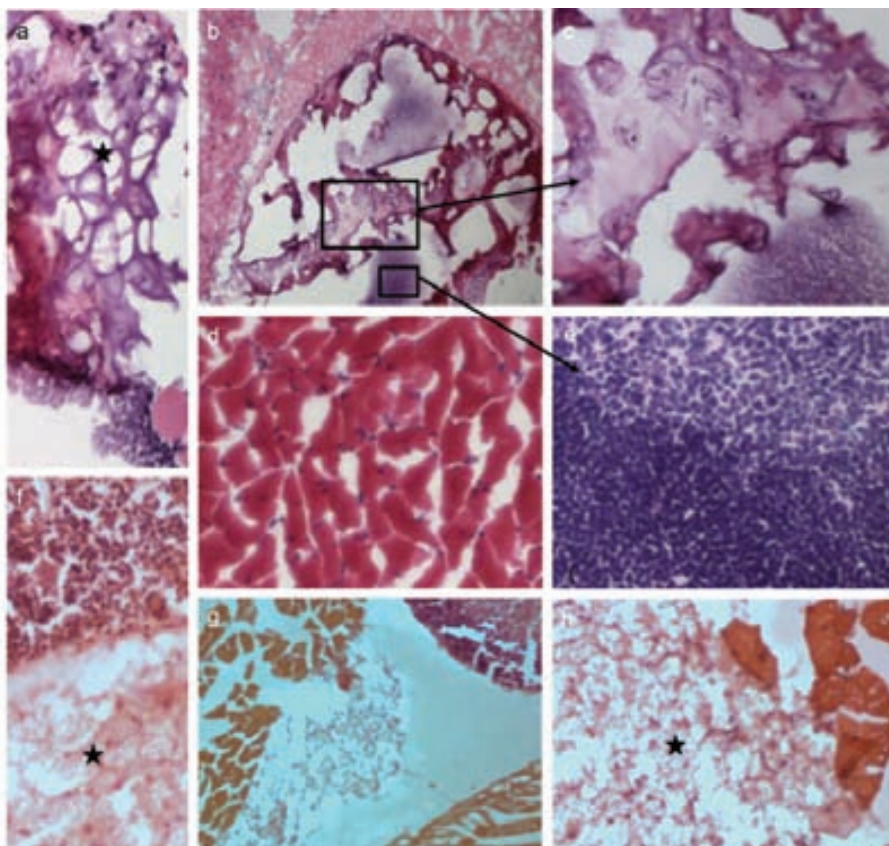


Fig. 47. Secciones histológicas de las implantaciones IM en los ratones BALB/c nu/nu teñidas con H-E. Remanente de un hidrogel de gelatina-glutaraldehído (estrella), 20X (a). Remanente de una esfera de alginato en el tejido muscular infiltrado por linfocitos 10X (b). Ampliación de (b), 20X (c). Sección de tejido muscular colindante al lugar de implantación de las esferas de alginato, 20X (d). Ampliación de la infiltración celular encontrada en las esferas de alginato, 20X (e). Remanente de un hidrogel de PEG-RGD (estrella), 20X (f, h). Hidrogel de PEG-RGD rodeado de tejido muscular, 10X (g). (Objetivos: 10X/0,3 y 20X/0,5).

Sólo se pudieron obtener los soportes de quitosano no expulsados y los hidrogeles de PEG-RGD (el único material que permitió una alta proliferación celular), el resto de materiales no se pudieron recuperar para examinarlos visualmente, asumiendo así su degradación *in vivo*.

Macroscópicamente, los hidrogeles de PEG-RGD, se encontraron parcialmente degradados y muy vascularizados (Fig. 48), formando parte del tejido SC o IM donde se habían implantado.

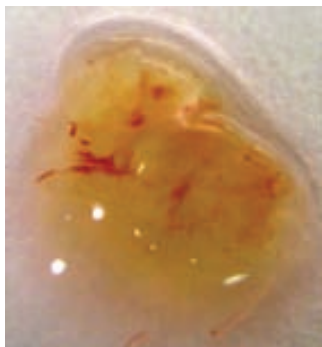


Fig. 48. Aspecto de un hidrogel de PEG-RGD sembrado con células G-Luc-C3H/10T1/2 recuperado de una implantación subcutánea después de 90 días. El material se encontraba adherido a los tejidos adyacentes y rodeado de capilares.

1.7. Recuperación de las células de los implantes y estabilidad de la expresión de EGFP y PLuc

Al final de los 3 meses del test *in vivo*, se aislaron muestras del tejido muscular donde se habían implantado materiales sembrados con células marcadas, se hicieron explantes y se cultivaron durante 20 días hasta que se observaron células EGFP positivas saliendo de los explantes. Las células G-Luc-C3H/10T1/2 recuperadas fueron detectadas por microscopía de fluorescencia y por BLI con el sistema de imagen Orca 2BT (Fig. 49), demostrando que las células seguían expresando EGFP y PLuc.

Una vez recuperadas, las células se expandieron, se seleccionaron diferentes fracciones positivas por FACS y se analizaron dichas fracciones luminométricamente.

Como se puede observar en la figura 50, las células recuperadas de los explantes se distribuían en dos poblaciones diferentes, ambas menos fluorescentes que las mismas células en el momento del sembrado de los materiales. Además, el análisis luminométrico de estas poblaciones, mostró que la capacidad de producción de fotones de las células recuperadas de los explantes había disminuido durante el período de implantación *in vivo* más su posterior recuperación y expansión.

Recientemente se ha descrito que los genes introducidos en células mediante vectores retrovíricos pueden sufrir silenciamiento por metilación de sus zonas promotoras¹⁵⁴.

Aunque no fue posible averiguar si la pérdida de expresión observada tenía lugar *in vivo*, se intentó determinar si el cultivo *in vitro* de las células contribuía de modo significativo a ello. Con este propósito, se mantuvo un cultivo de células G-Luc-C3H/10T1/2, del mismo pase que las sembradas en los materiales, durante 3 meses *in vitro* y cada 2 semanas se analizaron alícuotas del cultivo para determinar su capacidad de producción de luz por ng de ADN. La figura 51 muestra una gráfica de la producción de luz/ng de ADN frente al tiempo de cultivo en la que se observa una clara disminución de la expresión de PLuc desde las primeras semanas de cultivo *in vitro*.

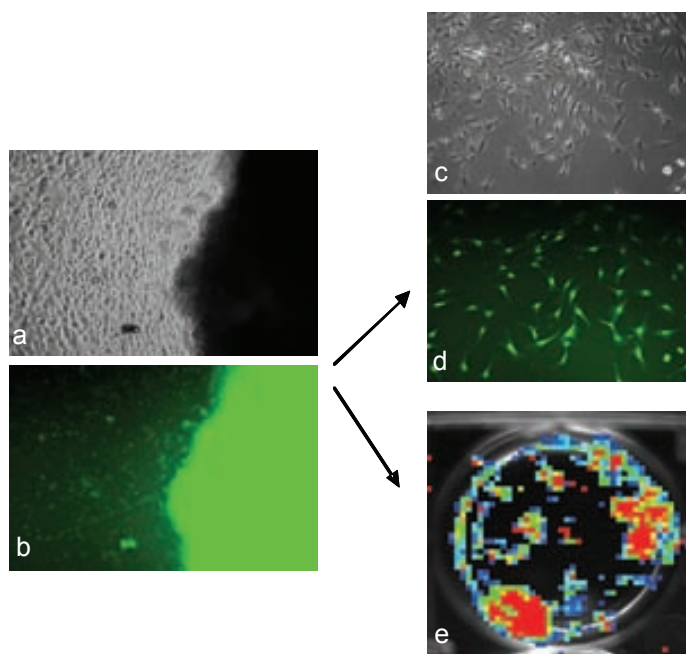


Fig. 49. Recuperación de las células G-Luc-C3H/10T1/2 de los implantes. Células fluorescentes saliendo de un explante (la autofluorescencia verde del explante se debe al colágeno muscular), 20X (a, b). Aspecto de las células durante la expansión posterior, 20X (c, d). Imagen mostrando la producción de fotones por las células recuperadas del explante (e).

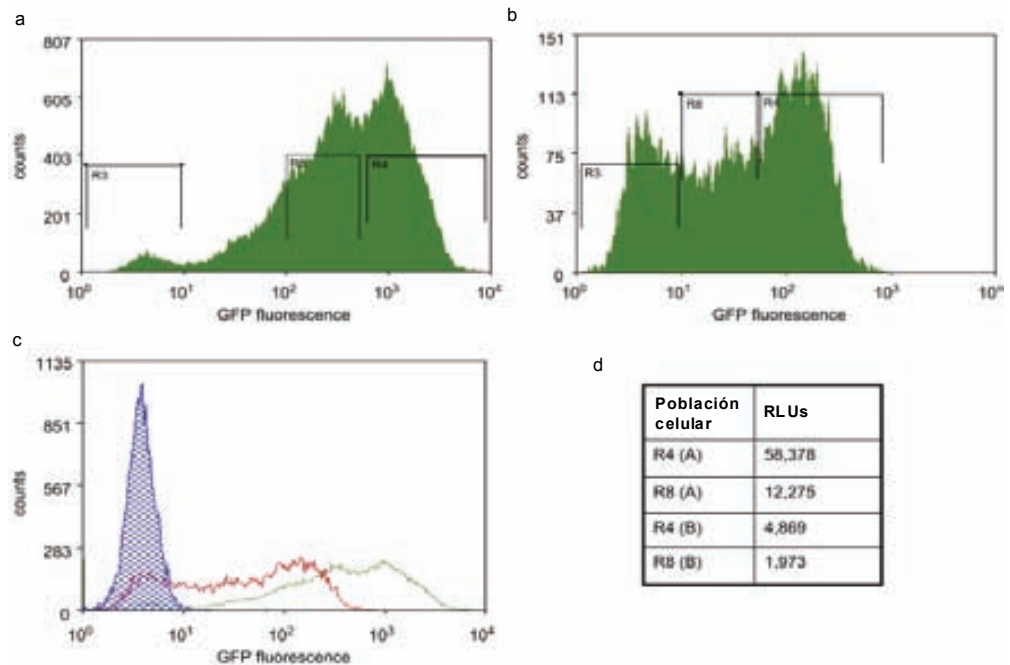


Fig. 50. Cambios en la fluorescencia y luminiscencia de las células G-Luc-C3H/10T1/2 tras la implantación *in vivo* y el posterior cultivo *in vitro*. Análisis por FACS de las células G-Luc-C3H/10T1/2 (a, b). Las gráficas muestran la intensidad de la fluorescencia (eje X) en referencia al número de células (cuentas). Células G-Luc-C3H/10T1/2 usadas para sembrar los materiales (a). Células G-Luc-C3H/10T1/2 recuperadas tras la implantación y la expansión posterior (b). (R3=células no fluorescentes; R8=facción celular poco fluorescente; R4=facción celular muy fluorescente). Superposición de las gráficas de (a) línea verde y (b) línea roja y de células C3H/10T1/2 control no transducidas (línea azul) (c). Actividad luciferasa (RLUs/célula) de las fracciones celulares R4 y R8 de (a) y (b), (d).

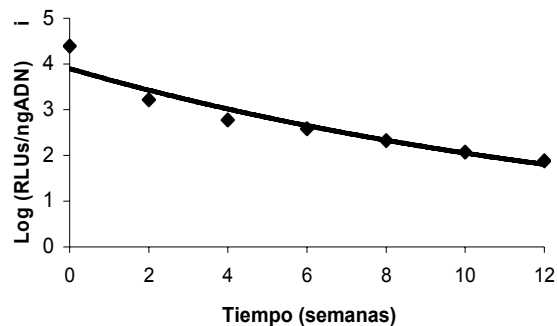


Fig. 51. Expresión de la Pluc *in vitro*. Log(RLUs/ngDNA) de los lisados celulares obtenidos frente al tiempo de cultivo.

2. Análisis de la proliferación de células C57BL/6 en un soporte de estructura nanofibrilar

El péptido RAD16-I forma, al autoensamblarse, un hidrogel de estructura tridimensional de nanofibras que imita el ambiente de la matriz extracelular y por tanto debería facilitar el crecimiento, la migración y la diferenciación de las células sembradas en el hidrogel *in vivo*.

Debido a que el hidrogel de RAD16-I tiene poca rigidez mecánica, para estudiar la proliferación celular en este análogo de la matriz extracelular, se decidió valorar a la vez la utilización de un soporte mixto compuesto por RAD16-I y *biorubber* (cedido por el Dr. Borrós, Institut Químic de Sarrià, Barcelona), un polímero sintético de porosidad controlable y de rigidez superior a la del hidrogel RAD16-I. Para ello se sembraron células C57BL/6, una línea celular similar a la C3H/10T1/2 utilizada anteriormente, que previamente había demostrado (Dr. Semino, MIT, Boston) una buena proliferación en el hidrogel peptídico de RAD16-I *in vitro*¹⁴⁴.

2.1. Producción de luz de las células C57BL/6

2.1.1. Producción de luz *in vitro*

Debido a que el marcaje con vectores retrovíricos puede promover el silenciamiento de los genes trazadores, las células C57BL/6 se marcaron con vectores lentivíricos para la expresión constitutiva de EGFP y PLuc. Para facilitar su detección, se seleccionó por FACS el 30% de las células más fluorescente (G-Luc-C57BL/6) y se expandieron las células. Inmediatamente antes del sembrado de las células (en el pase 10) se realizó una curva estándar de producción de luz *in vitro* para determinar la cantidad de luz generada por las células (Fig. 52 a). La pendiente de la recta de regresión, es decir, el número de RLUs producidas por una célula G-Luc-C57BL/6, que se obtuvo fue de 7,6 RLUs/célula.

Además, para determinar la estabilidad de los transgenes, se siguió la expresión de luciferasa en estas células en cultivo durante 3 meses (Fig. 52 b). Se observó que durante este período, la expresión de la PLuc (expresada como RLUs/ng ADN) se mantuvo estable.

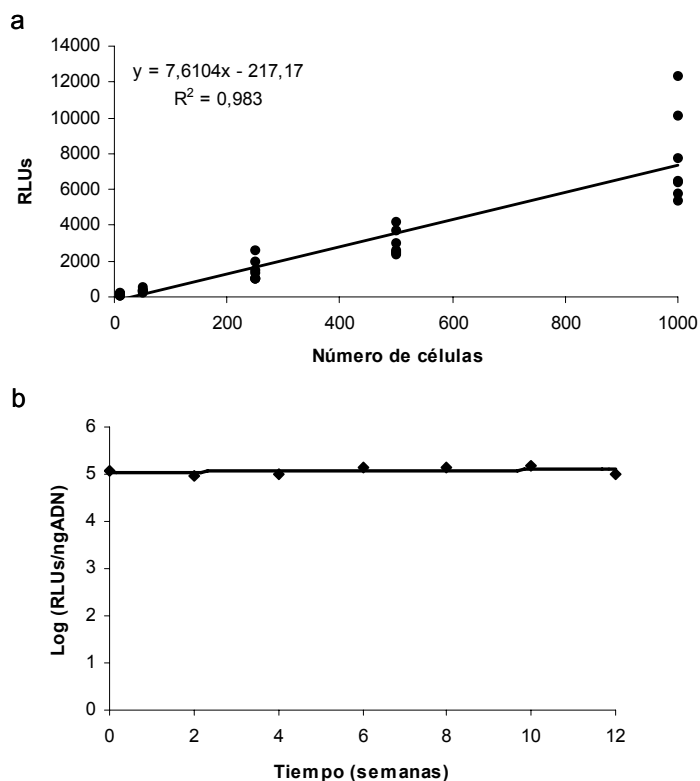


Fig. 52. Luminiscencia *in vitro* de las células G-Luc-C57BL/6. Capacidad de producción de luz de 10, 50, 250, 500 y 1000 células (a). Expresión de la PLuc *in vitro* representada con el Log (RLUs/ngADN) frente al tiempo de cultivo (b). R = coeficiente de correlación.

2.1.2. Producción de luz *in vivo*

Para determinar la sensibilidad de la detección de las células marcadas *in vivo*, se inyectaron $5 \cdot 10^2$, 10^3 , $5 \cdot 10^3$, 10^4 , $5 \cdot 10^4$, 10^5 y $5 \cdot 10^5$ células G-Luc-C57BL/6 en los muslos de ratones BALB/c nu/nu y se tomaron imágenes después de inocular la luciferina en el sitio de inyección de las células. El número de PHCs detectados en las imágenes (Fig. 53 a) se representó frente al número de células inyectadas (Fig. 53 b)

una vez se hubo sustraído el ruido de fondo utilizando un área de la imagen donde no se habían inyectado células.

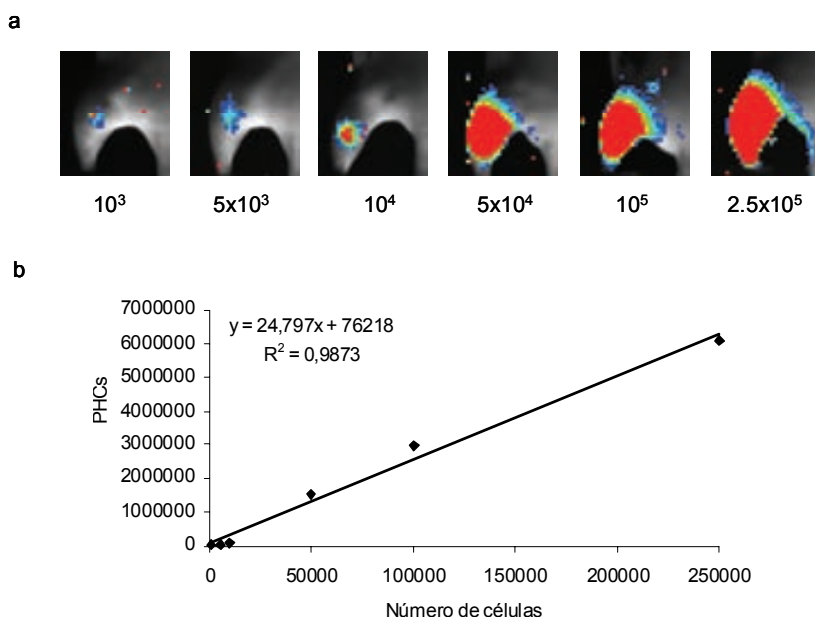


Fig. 53. Detección de las células G-Luc-C57BL/6 *in vivo*. Imágenes tomadas después de la inoculación de las células y la administración de luciferina en el mismo lugar de inyección de las células (a). Recta patrón de los PHCs detectados respecto al número de células inyectadas (b). R = coeficiente de correlación.

La gráfica de la figura 53 muestra que se puede detectar un mínimo 10^3 células G-Luc-C57BL/6 inoculadas IM y que *in vivo* los PHCs detectados por célula eran 24,8.

2.2. Cultivo *in vitro* de las células G-Luc-C57BL/6 sembradas en los soportes

Para determinar la compatibilidad de las células G-Luc-C57BL/6 y los biomateriales RAD16-I y *biorubber*, se sembraron células G-Luc-C57BL/6 en hidrogeles de RAD16-I o en hidrogeles de RAD16-I con *biorubber*, como se describe en materiales y métodos. Para analizar la distribución de las células en estos materiales, se hicieron tinciones

histológicas de secciones de hidrogeles, de RAD16-I y de RAD16-I+*biorubber* previamente sembrados con células G-Luc-C57BL/6 y cultivados *in vitro* (Fig. 54).

Como se puede observar (Fig. 54 a, b), las células proliferaron preferentemente en el hidrogel peptídico, donde después de varios días formaron agrupamientos celulares, pero fueron incapaces de penetrar y colonizar el *biorubber* (Fig. 54 c, d).

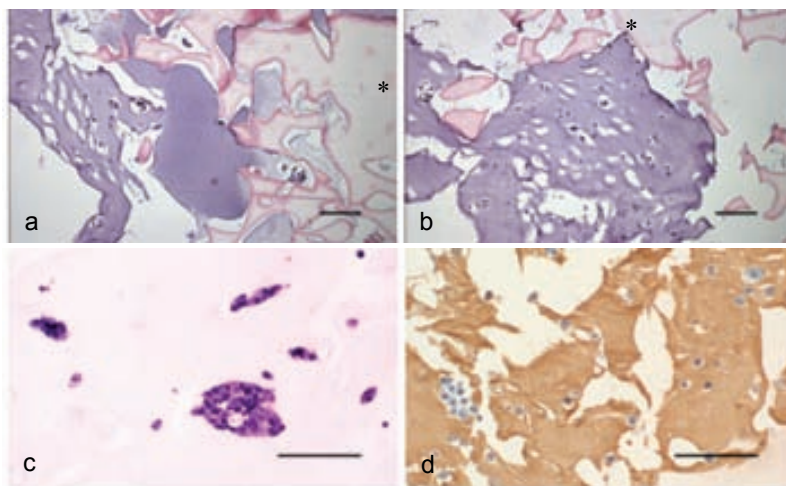


Fig. 54. Cultivo *in vitro* de células G-Luc-C57BL/6 sembradas en hidrogeles de RAD16-I o de RAD16-I+*biorubber*. Tinción HE de células G-Luc-C57BL/6 sembradas en un hidrogel compuesto de RAD16-I y *biorubber* (estrella) (a, b). Tinción HE de células G-Luc-C57BL/6 sembradas en un hidrogel de RAD16-I (c). Detección de biotina en hidrogeles RAD16-Ib sembrados y cultivados *in vitro* (d). Escala = 100 μ m.

2.3. Proliferación de las células G-Luc-C57BL/6 sembradas en hidrogeles RAD16-I o RAD16-I+*biorubber* *in vivo*

Durante 12 semanas se analizó la capacidad de proliferación de las células G-Luc-C57BL/6 sembradas en hidrogeles de RAD16-I o de RAD16-I+*biorubber*, implantados en localizaciones IM y SC en ratones BALB/c nu/nu, mediante procedimientos de BLI.

En la figura 55 se muestran las imágenes de un ratón representativo de cada grupo de 6 ratones y en la figura 56 los datos cuantitativos de la evolución de la proliferación de las células G-Luc-C57BL/6 sembradas en los geles implantados.

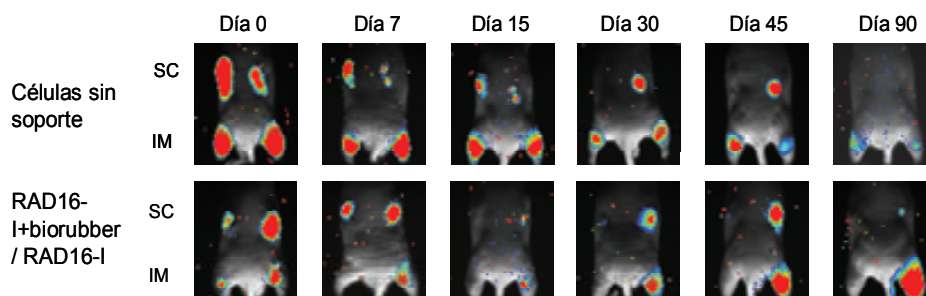


Fig. 55. Imágenes de bioluminiscencia generadas por las células G-Luc-C57BL/6, sembradas en hidrogeles RAD16-I o RAD16-I+biorubber, implantadas SC e IM en ratones BALB/c nu/nu. El panel superior corresponde a células implantadas sin soporte (controles). El panel inferior corresponde a células sembradas en hidrogeles de RAD16-I (parte derecha del ratón) o de RAD16-I+biorubber (parte izquierda del ratón).

El día 0 (implantación), las células G-Luc-C57BL/6 inyectadas sin soporte y los hidrogeles RAD16-I sembrados fueron fácilmente detectables en todos los animales. Sin embargo, las células sembradas en hidrogeles RAD16-I + *biorubber* sólo se detectaron en 2 de 5 implantaciones SC y en 3 de 5 implantaciones IM. Estas diferencias están probablemente relacionadas con los resultados obtenidos *in vitro*, mostrando que aunque el *biorubber* no es tóxico para las células, tampoco permite su colonización (presumiblemente debido al tamaño de los poros y a la falta de comunicación entre ellos).

Las implantaciones SC de células G-Luc-C57BL/6 tanto sin soporte como sembradas en los materiales, tendieron a desaparecer como ya se había descrito para otros tipos celulares y materiales¹⁵⁵. Sólo una implantación SC, del grupo RAD16-I+G-Luc-C57BL/6, era visible al final del experimento.

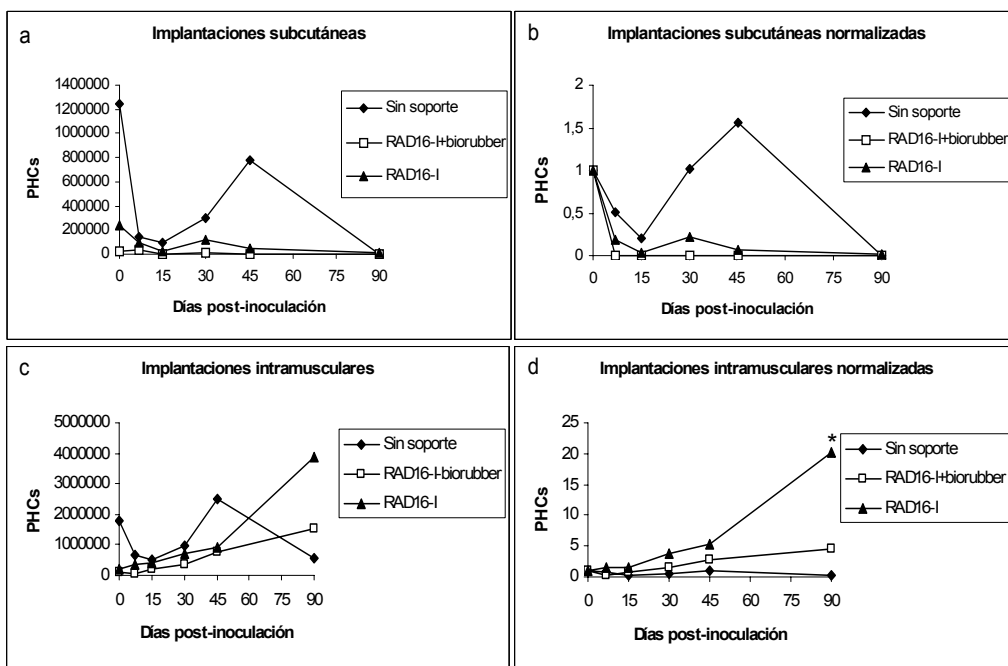


Fig. 56. Análisis cuantitativo de los PHCs detectados en las imágenes después de sustraer el ruido de fondo utilizando un área sin células. Representación de los PHCs detectados en las implantaciones SC (a) e IM (b) frente al tiempo post-inoculación. Para compensar las diferencias en el sembrado de los materiales, los PHCs se representan normalizados para cada tiempo respecto a los PHCs del día 0 (c, d). Los diferentes símbolos representan las medias de cada grupo en los tiempos de medición. El asterisco representa las diferencias estadísticamente significativas.

Las células G-Luc-C57BL/6 inyectadas IM sin soporte sufrieron una primera crisis a los 7 días, seguida de una fase de recuperación, para empezar a disminuir otra vez a los 45 días. Las células G-Luc-C57BL/6 sembradas en RAD16-I+*biourubber* desaparecieron en 4 de los 5 animales implantados y proliferaron en uno. Las células sembradas en RAD16-I proliferaron desde el principio en 4 de los 5 animales del grupo. El crecimiento de las células G-Luc-C57BL/6 en el hidrogel RAD16-I fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) comparado con el crecimiento de las células sin soporte y el crecimiento de las células sembradas en RAD16-I+*biourubber*.

2.4. Migración de las células implantadas

Un aspecto importante en la ingeniería tisular es el destino y la bioseguridad de las células implantadas. El análisis luminométrico, mediante la detección de la actividad luciferasa, de homogeneizados de tejido (cerebro, bazo, pulmones, hueso, ganglios e hígado) obtenidos al final del período *in vivo* de los ratones BALB/c nu/nu, no demostró la existencia de números de células G·Luc-C57BL/6 detectables en estos tejidos.

2.5. Respuesta de los ratones BALB/c a los materiales implantados

Para detectar una posible reacción adversa a los materiales utilizados en este estudio, se implantó RAD16-Ib y RAD16-Ib+*biorubber* IM y SC. Se utilizó RAD16-Ib (RAD16-I modificado con biotina) debido a la dificultad para detectar RAD16-I en los tejidos. Se obtuvieron muestras de la zona del implante y se procesaron para su posterior análisis histológico. En el examen macroscópico no se observó inflamación en las zonas de implantación, el músculo o la cavidad SC de los ratones y los nódulos linfáticos presentaron tamaño y aspecto normales.

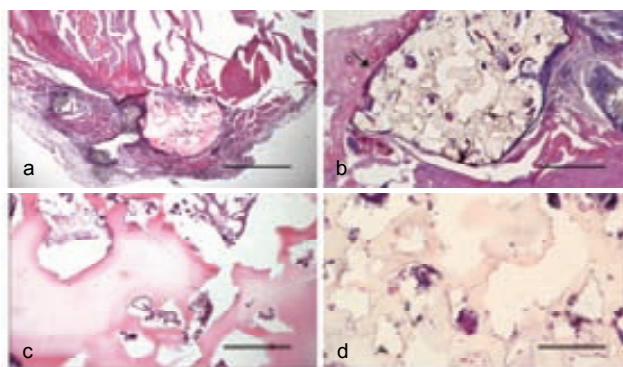


Fig. 57. Tinción HE de las secciones musculares de los lugares de implantación de RAD16-Ib+*biorubber*. Muestras obtenidas el día 15 (a, c) y el día 45 (b, d) post-implantación. Se observa una cápsula fibrosa alrededor del RAD16-Ib+*biorubber* implantado (flecha). Escala_{a,b} = 500µm, escala_{c,d} = 100µm.

En las secciones obtenidas (Fig. 57) no fue posible identificar el material RAD16-Ib, por lo que se asumió que el hidrogel peptídico había sido degradado antes del día 15. Por el contrario, se pudo observar que el *bi rubber* se mantuvo sin degradar durante las 12 semanas del experimento y que estaba encapsulado por tejido fibroso sin infiltración de linfocitos.

2.6. Análisis histológico de los implantes en ratones

BALB/c nu/nu

Para estudiar la respuesta de los ratones BALB/c nu/nu a los hidrogeles de RAD16-I y RAD16-I+*bi rubber* sembrados con células G-Luc-C57BL/6 y la posible distribución de estas células, se realizaron análisis histológicos de la zona de implantación al final de las 12 semanas del período de observación *in vivo*. Las secciones (10µm) del tejido aislado se tiñeron con tricrómico de Masson, para poder localizar las células EGFP positivas en el tejido muscular, ya que esta tinción reduce sustancialmente la autofluorescencia de fondo propia del colágeno presente en el tejido muscular, o con HE para determinar la localización y el estado del implante (Fig. 58).

La tinción con tricrómico de Masson permitió la localización de algunas células EGFP positivas, con diferentes morfologías, en el tejido muscular colindante al implante (Fig. 58 a-d).

En las tinciones de HE, se observó que el *bi rubber* no se había degradado y que a su alrededor se había formado una cápsula fibrosa, además de la presencia de células en el interior de dicho material (Fig. 58 e, f). Estos resultados concuerdan con los observados en las histologías de los ratones BALB/c, en los que se habían implantado hidrogeles de RAD16-Ib y de RAD16-Ib+*bi rubber* sin células sembradas.

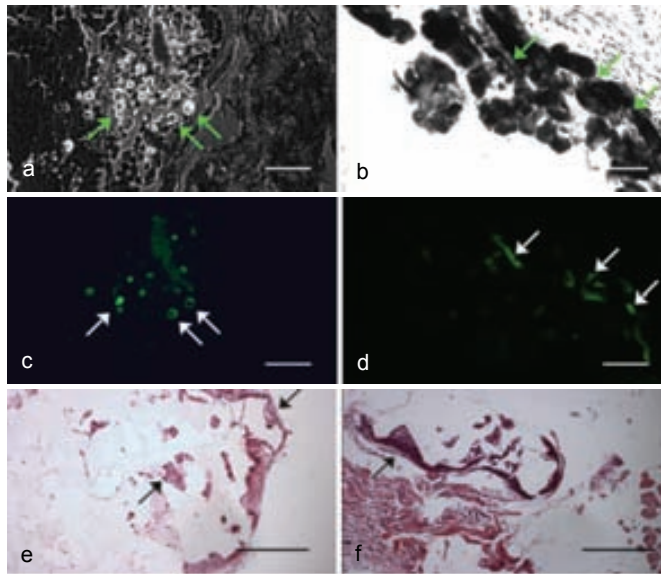


Fig. 58. Análisis histológico de los implantes en ratones BALB/c nu/nu. Imágenes de secciones musculares teñidas con tricrómico de Masson, obtenidas con un microscopio de contraste de fase con luz normal (a, b) o con luz UV (c, d). Las flechas indican las células G·Luc-C57BL/6. Imágenes de secciones musculares teñidas con HE (e, f), las flechas indican el tejido fibroso alrededor del implante. Escala = 200 μ m.

Capítulo II

Aplicación de células mesenquimales humanas sembradas en un hidrogel de polietilenglicol en la regeneración ósea.

1. Análisis de la implantación de hMSCs en un modelo de lesión ósea.

Los resultados obtenidos en el modelo ectópico de comparación de diferentes tipos de materiales, indican que las observaciones *in vitro* del comportamiento de combinaciones de células y materiales no son, en general, un reflejo válido de su futuro comportamiento *in vivo*. Además se observó, que la evolución de las combinaciones de células y materiales es muy dependiente del lugar de implantación, y que uno de los parámetros más determinantes es la capacidad de vascularizarse.

Estas observaciones reafirmaron la necesidad de generar un modelo clínicamente relevante, para el análisis *in vivo* del comportamiento de combinaciones de células y materiales, mediante un procedimiento de imagen no invasivo. En particular, se decidió comparar la capacidad de regeneración del tejido óseo de dos tipos celulares potencialmente interesantes para este fin, las células hMSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo. Se consideró la utilización de estos dos tipos celulares por su capacidad de diferenciación a tejido óseo y su posible aplicación autóloga.

En estudios previos (Resultados, Capítulo I) se observó que el hidrogel de PEG-RGD y el hidrogel peptídico RAD16-I eran los materiales que permitían una mayor proliferación de las células sembradas *in vivo*. Debido a las características físicas y estructurales de ambos materiales se optó por el hidrogel de PEG-RGD para la implantación de células hAMSCs y hBMSCs marcadas mediante vectores víricos en un modelo de lesión ósea.

1.1. Caracterización de las células hMSCs *in vitro*.

El patrón de crecimiento *in vitro* de las hMSCs obtenidas de pacientes jóvenes tanto de tejido adiposo (hAMSCs) como de médula ósea (hBMSCs) se caracterizó por una primera fase de un crecimiento rápido (tiempo de duplicación de 5 días) que duró 20

pases en las hAMSCs y 9 en las hBMSCs. A partir de este momento se ralentizó el crecimiento, el tiempo de duplicación se incrementó a 8 días para las hAMSCs durante el resto del tiempo de cultivo y a 10 días para las hBMSCs durante 2 pases (en el pase 12 estas células dejaron de proliferar).

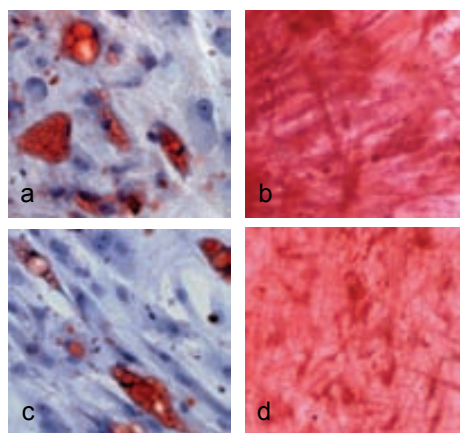


Fig. 59. Diferenciación de las células G-Luc-hAMSCs y G-Luc-hBMSCs. Tinción oil red O para lípidos (a, c). Tinción rojo de alizarina S para depósitos de calcio (b, d). Células G-Luc-hAMSCs (a, b) y células G-Luc-hBMSCs (c, d).

Durante el pase 2, ambos tipos celulares se marcaron con vectores lentivíricos para la expresión constitutiva de EGFP y PLuc. Se seleccionó mediante FACS el 5% más fluorescente de las hAMSCs (G-Luc-hAMSCs) y el 35% más fluorescente de las hBMSCs (G-Luc-hBMSCs). Posteriormente se expandieron las células hasta el pase 7, durante el cual se sembraron en el hidrogel de PEG-RGD descrito anteriormente y se trataron con medios de diferenciación específicos para tejido óseo y adiposo. Se determinó que, *in vitro*, las células retenían su capacidad de diferenciación hacia ambos tejidos (Fig. 59) detectada mediante las tinciones de rojo de alizarina S para tejido óseo y oil red O para tejido adiposo.

1.2. Producción de luz por las células G·Luc-hAMSCs y G·Luc-hBMSCs.

1.2.1. Producción de luz *in vitro*

La capacidad de las células para producir luz (actividad de la PLuc) en cultivo se midió en lisados celulares mediante un luminómetro. La figura 60 (a, b) muestra las curvas estándar de producción de luz frente al número de células para cada tipo celular.

La pendiente de cada recta de regresión indica la capacidad de producción de luz/célula, que correspondió a 144,9 RLUs/célula para las G·Luc-hAMSCs y a 27,2 RLUs/célula para las G·Luc-hBMSCs.

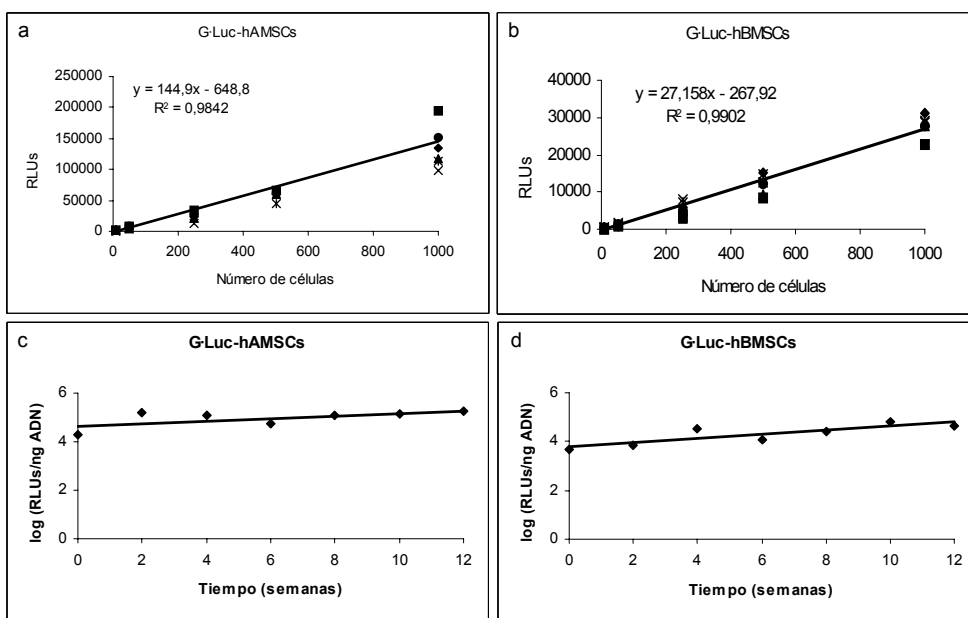


Fig. 60. Capacidad de producción de luz *in vitro* de las células G·Luc-hAMSCs y G·Luc-hBMSCs. Rectas de regresión mostrando la actividad luciferasa (RLUs) frente al número de células para las células G·Luc-hAMSCs (a) y las G·Luc-hBMSCs (b). Estabilidad en el tiempo de la expresión de PLuc *in vitro* en las G·Luc-hAMSCs (c) y las G·Luc-hBMSCs (d). R = coeficiente de correlación.

Para determinar la estabilidad de la expresión de la PLuc a lo largo del tiempo, las células G·Luc-hAMSCs y G·Luc-hBMSCs se mantuvieron en cultivo durante 3 meses y

cada dos semanas se obtuvieron lisados celulares en los que se midió la actividad luciferasa. Como ya se había observado con las células G-Luc-C57BL/6 (también marcadas con vectores lentivíricos), se observó que la cantidad de luz/ng de ADN no disminuía tanto para las células G-Luc-hAMSCs como para las G-Luc-hBMSCs (Fig. 60 c, d).

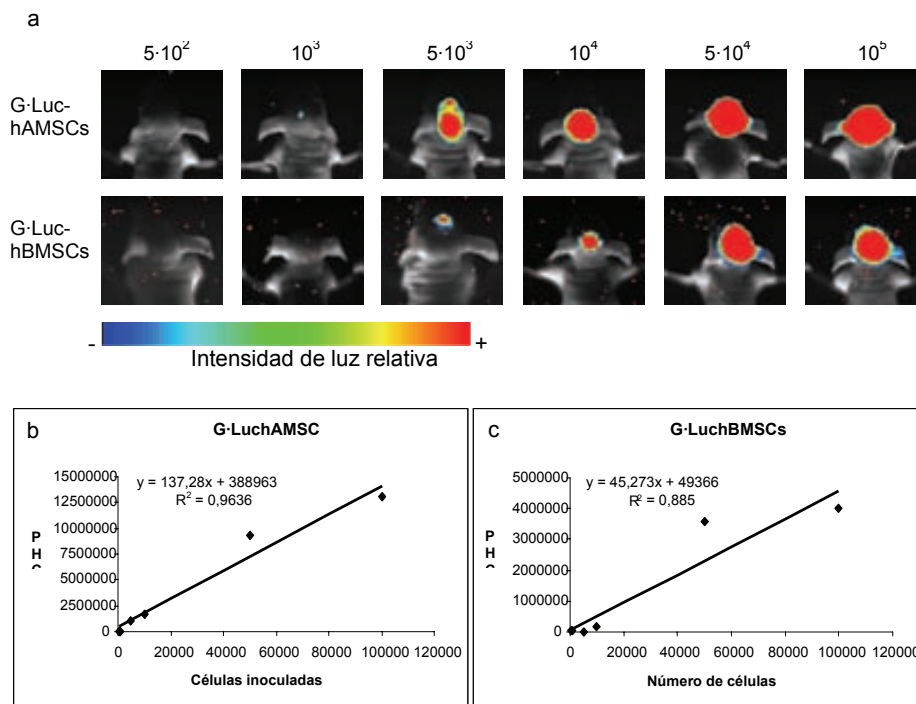


Fig. 61. Sensibilidad de la luminiscencia *in vivo* de las células G-Luc-hAMSCs y G-Luc-hBMSCs. Imágenes post inoculación de las células y la luciferina (a) (máxima intensidad=rojo, mínima=azul). Rectas de regresión de los PHCs captados frente al número de células inoculadas (b, c). R = coeficiente de correlación.

1.2.2. Producción de luz *in vivo*

Para determinar la capacidad de detección de las células G-Luc-hAMSCs y G-Luc-hBMSCs *in vivo*, se inocularon SC sobre el hueso de la bóveda craneal de ratones BALB/c nu/nu, $5 \cdot 10^2$, 10^3 , $5 \cdot 10^3$, 10^4 , $5 \cdot 10^4$ y 10^5 células G-Luc-hAMSCs o G-Luc-

hBMSCs y se adquirió una imagen (Fig. 61 a) inmediatamente después de inocular luciferina SC en la zona de implantación.

Se observó una relación lineal entre los PHCs extraídos de la imágenes y el número de células inoculadas en los ratones (Fig. 61 b, c) para los dos tipos celulares. Las imágenes obtenidas (Fig. 61 a) mostraron que el número mínimo de células que se podían detectar con el sistema de imagen Orca era de 1.000 células G-Luc-hAMSC y 5.000 células G-Luc-hBMSC. El número de PHCs por célula detectados no invasivamente (las pendientes de las rectas de regresión, Fig. 61 (b, c) fueron 137,28 para las células G-Luc-hAMSC y 45,27 para las células G-Luc-hBMSC.

1.3. Análisis de la capacidad de proliferación de las células G-Luc-hAMSCs y G-Luc-hBMSCs *in vivo*.

Para analizar la capacidad de proliferación de estos dos tipos celulares en una lesión ósea se implantaron en defectos producidos en el hueso de la bóveda craneal de 20 ratones BALB/c nu/nu dos de los siguientes implantes:

- a) hidrogel de PEG-RGD sembrado con células G-Luc-hAMSCs
- b) hidrogel de PEG-RGD sembrado con células G-Luc-hBMSCs
- c) hidrogel de PEG-RGD sin células
- d) defecto sin implante (control)

Se monitorizó la producción de luz de las células implantadas durante 12 semanas *in vivo* mediante BLI.

La observación previa a la implantación de los hidrogeles sembrados, por microscopía confocal, demostró una distribución tridimensional muy similar de los dos tipos celulares en el material (Fig. 62).

La figura 63 muestra las imágenes más representativas de cada grupo de ratones:

- Grupo 1: 10 ratones portadores de un defecto vacío y de un defecto con un implante de hidrogel de PEG-RGD sembrado con células G-Luc-hAMSCs.

- Grupo 2: 10 ratones portadores de un defecto con un implante del hidrogel de PEG-RGD sembrado con células G-Luc-hBMSCs y otro defecto con un implante del hidrogel de PEG-RGD sin células.

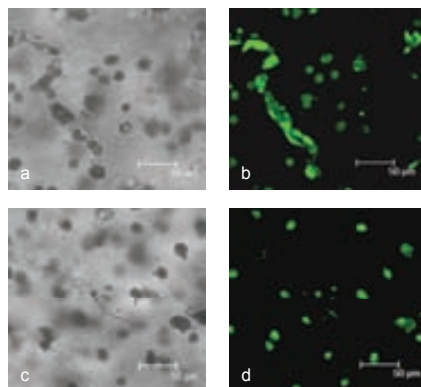


Fig. 62. Observación de los hidrogeles PEG-RGD sembrados antes de la implantación en los ratones BALB/c nu/nu. Después de sembrar el material se cultivaron los hidrogeles durante 10 días y antes de la implantación se observaron dos hidrogeles representativos sembrados con G-Luc-hAMSCs (a, b) e hidrogeles sembrados con G-Luc-hBMSCs (c, d) mediante un microscopio confocal (objetivo:63X/1,3). Campo claro (a, c). Imágenes tomadas con iluminación por un láser verde para EGFP (b, d).

El análisis de las imágenes mostró que 4 de los 10 hidrogeles sembrados con células G-Luc-hAMSCs y 7 de los 10 sembrados con células G-Luc-hBMSCs, tenían células que producían luz a los 3 meses de la implantación. Para cuantificar la proliferación de las células sembradas en los hidrogeles, se sustrajo el ruido de fondo de los PHCs extraídos de las imágenes (Fig. 63) y se representaron estos valores frente al tiempo post implantación (Fig. 64).

El análisis cuantitativo de la producción de luz durante los 3 meses de implantación *in vivo*, muestra que los dos tipos celulares sembrados siguieron patrones de crecimiento similares. Este patrón se caracterizó por una crisis de crecimiento en las primeras 4 semanas, seguida por una estabilización en el número de células hasta el final del experimento (Fig. 64 c,d). Sin embargo, mientras que se produjo un descenso de un 63% en las células G-Luc-hBMSCs respecto a las implantadas el día 0, las células

G·Luc-hAMSCs sufrieron una crisis más pronunciada durante el mismo período, sobreviviendo sólo un 5% de las células inicialmente implantadas ($p = 0,0543$).

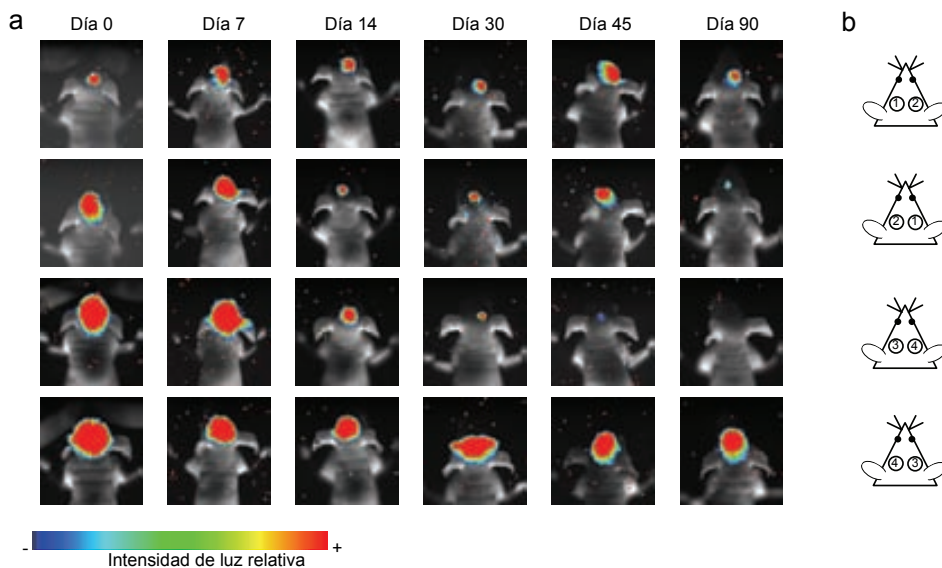


Fig. 63. BLI de un ratón representativo de cada grupo. Imágenes de los fotones detectados de las G·Luc-hAMSCs y de las G·Luc-hBMSCs superpuestas sobre la correspondiente imagen de campo claro (a) (máxima intensidad=rojo, mínima=azul). Esquema de la localización de los implantes en el hueso de la bóveda craneal de los diferentes grupos (b): defecto vacío (1), PEG-RGD+G·Luc-hAMSCs (2), PEG-RGD sin células (3), PEG-RGD+G·Luc-hBMSCs (4).

1.4. Tomografía axial computerizada (TAC)

Paralelamente al análisis de BLI, se evaluó el cambio en la densidad de los defectos experimentales. Para ello se realizaron imágenes de rayos X a los ratones BALB/c nu/nu implantados al principio, mitad y final del período experimental, utilizando un tomógrafo de tercera generación (TAC EXEL 2400 ELITE). Posteriormente estas imágenes se analizaron utilizando el software incorporado en el tomógrafo. La figura 65 muestra una imagen de rayos X del día 0, en la que se observa que los defectos óseos experimentales comprendían todo el grosor del hueso de la bóveda craneal.

Se calcularon además las densidades del hueso contiguo a los defectos, la densidad del aire y la de la masa cerebral. La densidad del hueso contiguo oscilaba entre 170 y 230, la densidad del aire era de -1000 y la del cerebro oscilaba entre -3 y -10.

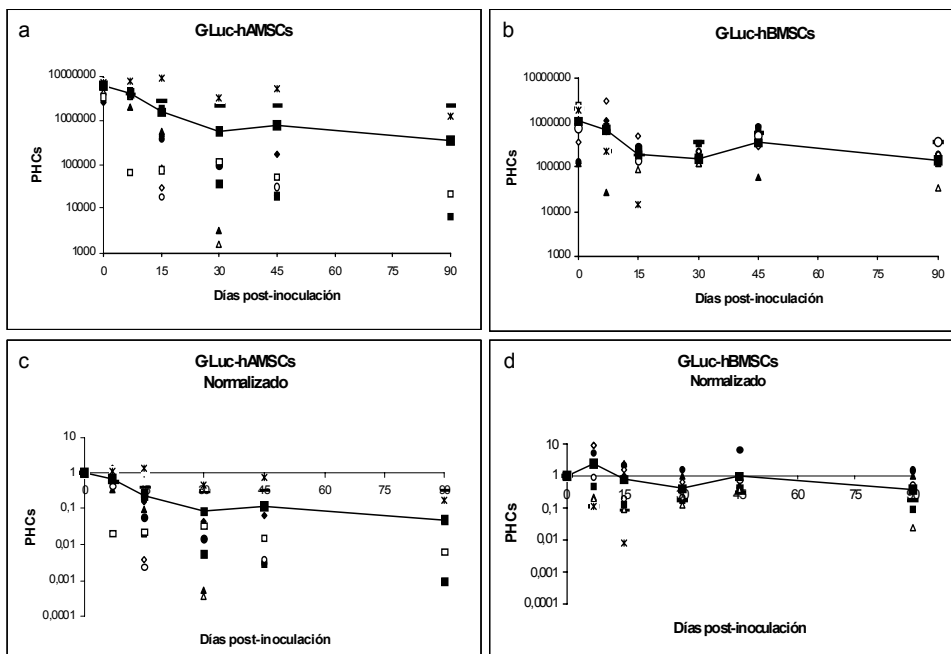


Fig. 64. Análisis cuantitativo de los datos de bioluminiscencia. PHCs detectados de las imágenes de PEG-RGD+G·Luc-hAMSCs (a) y de PEG-RGD+G·Luc-hBMSCs (b), después de sustraer el ruido de fondo, representados frente al tiempo post-inoculación. Para facilitar el análisis los PHCs detectados normalizados respecto a los valores del día 0 fueron también representados frente al tiempo post-inoculación (c, d). La línea sólida representa la media del grupo para cada tiempo.

El cambio medio en la densidad de los defectos para cada grupo en función del tiempo se representa en la figura 65 b. Aunque la densidad de los defectos aumentó en todos los grupos, en ninguno de ellos se llegó a alcanzar la densidad del hueso adyacente normal. El aumento de densidad observado en los defectos en los que se implantaron hidrogeles de PEG-RGD sembrados con G·Luc-hAMSCs o con G·Luc-hBMSCs fue superior al aumento de densidad de los defectos en los que se implantó el hidrogel PEG-RGD sin células ($p = 0,09$). El incremento en la densidad de los defectos en los que se implantaron el hidrogeles PEG-RGD tanto sembrados como sin sembrar fue

estadísticamente significativo ($p < 0,05$) respecto al incremento en la densidad de los defectos control sin implante. Sin embargo, los defectos sin implante, mostraron un aumento de densidad pequeño aunque detectable a lo largo del experimento.

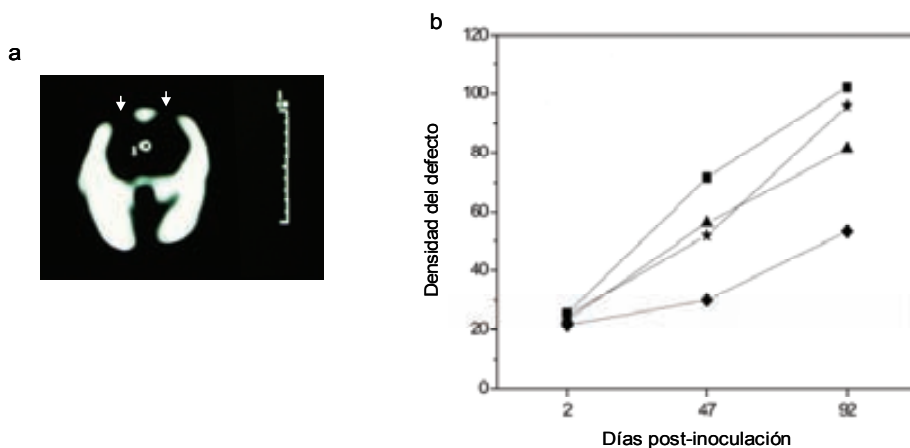


Fig. 65. Análisis por TAC de la densidad en los defectos óseos. Imagen longitudinal típica de un TAC del día 0 mostrando los defectos (flechas) (a). El círculo situado en la zona oscura (tejido cerebral) bajo los defectos óseos es el cursor para definir la zona de análisis de la densidad. Media de las densidades registradas para cada grupo frente a los días post-inoculación (b). Defecto control sin implante (◆), PEG-RGD sin células (▲), PEG-RGD+G-Luc-hAMSCs (★), PEG-RGD+G-Luc-hBMSCs (■). (n=10)

Estos resultados muestran que, en lo referente al incremento de densidad del tejido reparado en los implantes, medido por rayos X, los implantes de PEG-RGD sembrados fueron superiores a los implantes sin sembrar y en éstos últimos la reparación fue superior a la de los defectos control. El hecho de que los implantes de PEG-RGD sin células produzcan un aumento de densidad mayor que los defectos control, podría ser consecuencia de la colonización de los implantes por células del tejido óseo o de la dura madre adyacentes. No se observaron diferencias significativas, en el aumento de la densidad de los defectos implantados con hidrogeles PEG-RGD entre los sembrados con hAMSCs o con hBMSCs.

1.5. Migración de las células implantadas

Para determinar si las células implantadas se dispersaban de los hidrogeles de PEG-RGD a través de la dura madre, se midió la actividad luciferasa luminométricamente en lisados cerebrales de todos los ratones. Solamente un lisado cerebral, de un ratón implantado con PEG-RGD+G·Luc-hBMSCs, mostró una ligera luminiscencia de 1.540 RLU sobre un fondo de 150 RLU, correspondiente a aproximadamente 60 células, probablemente resultantes de una lesión de la dura madre al realizar el defecto óseo.

1.6. Histología

Para evaluar histológicamente el comportamiento de las células sembradas en los hidrogeles de PEG-RGD, al finalizar el período *in vivo*, el día 90 post-implantación, se aislaron muestras de los implantes que producían y que no producían luz. Se hicieron secciones (5 μ m) de dichos implantes y se tiñeron con HE y Von Kossa para detectar la colonización celular y la mineralización respectivamente (Fig. 66).

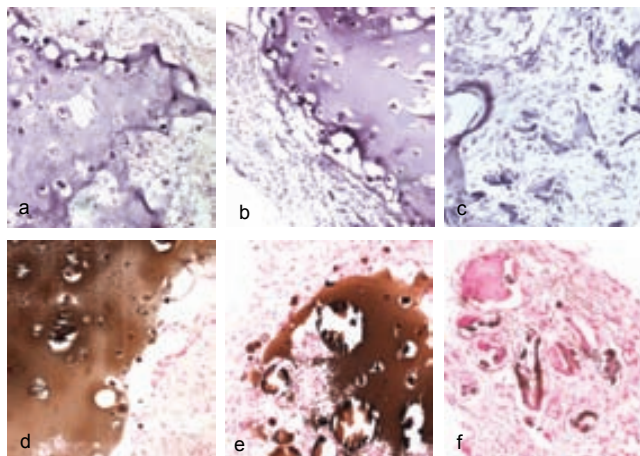


Fig. 66. Histología de los implantes. Secciones teñidas con H-E de PEG-RGD+G·Luc-hBMSCs (a), PEG-RGD+G·Luc-hAMSCs (b) y PEG-RGD sin células (c). Secciones teñidas con Von Kossa de PEG-RGD+G·Luc-hBMSCs (d), PEG-RGD+G·Luc-hAMSCs (e) y PEG-RGD sin células (f). Imágenes de las tinciones tomadas a 100X.

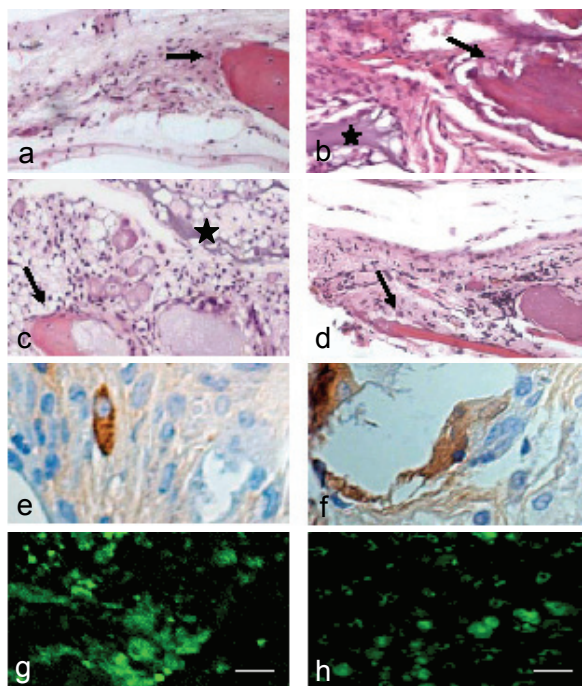


Fig. 67. Análisis histológico de los defectos óseos. Secciones teñidas con HE (a-d). Defecto sin implante mostrando el borde del hueso (flecha) (a), 100X. Defecto con PEG-RGD sin células (estrella) y zonas con apariencia de hueso (flecha) (b), 100X. Defecto con PEG-RGD+G-Luc-hAMSCs (estrella) y zona con apariencia de hueso (flecha) (c), 100X. Defecto con PEG-RGD+G-Luc-hBMSCs y zona con apariencia de hueso (flecha) (d), 100X. Detección de células EGFP positivas, por inmunohistoquímica, en la proximidad de (e) un PEG-RGD+G-Luc-hAMSCs y de (f) un PEG-RGD+G-Luc-hBMSCs, 400X. Microscopía confocal después de 90 días *in vivo* de (g) un PEG-RGD+G-Luc-hAMSCs y de (h) un PEG-RGD+G-Luc-hBMSCs (objetivo:63X/1,3).

La observación de las secciones teñidas mostró que los hidrogeles de PEG-RGD sembrados mantuvieron su estructura y contenían células (Fig. 66 a, b), mientras que los hidrogeles no sembrados habían sido extensivamente colonizados por células del huésped y parecían parcialmente degradados (Fig. 66 c). La tinción de Von Kossa de las secciones, indicó la presencia de sales de calcio en los hidrogeles de PEG-RGD sembrados con los dos tipos celulares, pero no en los hidrogeles de PEG-RGD sin células.

Los defectos óseos control sin implante no mostraron signos de regeneración (Fig. 67 a). Ocasionalmente, en la región circundante a los defectos implantados con hidrogeles PEG-RGD tanto con células como sin ellas, se observaron estructuras con

características de tinción semejantes a las del tejido óseo (Fig. 67 b-d). También se detectaron células EGFP positivas en el margen exterior de algunos implantes con células (Fig. 67 e, f).

La observación al microscopio confocal de los implantes que se utilizaron para las tinciones antes de la fijación, reveló la presencia de células EGFP positivas con diferentes morfologías en los implantes sembrados que producían luz el día 90 (Fig. 67 g, h). En los implantes que no producían luz el día 90 se detectaron muchas menos células EGFP positivas en correlación con los resultados de BLI.

1.7. Migración de las células del huésped

La observación de que los implantes sin células hubieran sido colonizados por células del huésped que no formaban estructuras con depósitos de sales de calcio, sugiere una posible implicación de la interacción, entre las células del huésped y las células hMSCs implantadas, en la mineralización observada en los implantes.

En un experimento preliminar destinado a analizar el comportamiento de las células del huésped que colonizan los implantes, se generaron defectos óseos en ratones C57BL/6 transgénicos para la proteína EGFP, en los que se implantaron hidrogeles de PEG-RGD o de gelatina-glutaraldehído sin células. Estos hidrogeles se examinaron por microscopía confocal a las 4 y 12 semanas post implantación.

Como indica la figura 68, mientras que las células del huésped que colonizaron los hidrogeles de gelatina-glutaraldehído conservaron una morfología esférica hasta las 12 semanas post-implantación, las células que colonizaron los hidrogeles de PEG-RGD adoptaron una morfología fibroblástica.

En futuros experimentos se utilizará esta estrategia sembrando hidrogeles con células MSCs, marcadas con luciferasa, extraídas de ratones C57BL/6 EGFP negativos, para analizar la interacción entre ambos tipos celulares y su implicación en la mineralización de los implantes.

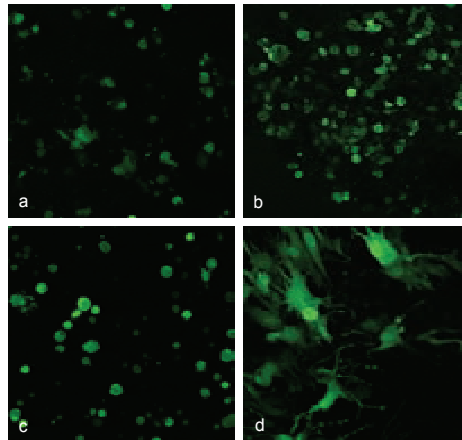


Fig. 68. Migración de las células del huésped (C57BL/6 transgénico heterocigoto para la EGFP) al interior de los geles implantados en el hueso de la bóveda craneal. Hidrogel de gelatina-glutaraldehído (a, b). Hidrogel de PEG-RGD (c, d). Un mes post implantación (a, c). Tres meses post implantación (b, d). Imágenes obtenidas por microscopía confocal (objetivo 63X sin zoom, $0,5\mu\text{m}$ entre cortes).

Capítulo III

Células progenitoras y transformación celular.

1. Análisis de la proliferación de las células BMC-9 *in vivo*

Para el desarrollo de una plataforma de análisis bioluminiscente no invasivo destinada a la evaluación de las interacciones célula progenitora/biomaterial, se consideró la conveniencia de disponer de líneas celulares, capaces de diferenciarse a los linajes de interés, entre ellos el osteoblástico. Aunque idealmente se deberían utilizar células progenitoras primarias, las inevitables variaciones individuales entre donantes, debidas a la disponibilidad, edad del donante, estado de salud, género, longitud telomérica, etc, son factores cuya influencia en el proceso regenerador es todavía desconocida en su mayor parte y constituyen un obstáculo considerable que dificulta el análisis. Por ello, se consideró la utilización de líneas celulares establecidas, de comportamiento más uniforme y documentado.

Uno de los tipos celulares estudiado en esta tesis fue la línea celular BMC-9. Se trata de una línea celular mesenquimal de médula ósea, capaz de diferenciarse a tejido adiposo, cartílago y hueso entre otros, derivada del ratón denominado "Immortomouse". Éste es un ratón transgénico, portador de la construcción H-2K^b-tsA58, que expresa una versión del antígeno T del virus SV40 sensible a la temperatura, creado con el fin de facilitar el establecimiento de líneas celulares¹⁵⁶. La expresión del antígeno T está bajo el control del promotor del complejo mayor de histocompatibilidad H-2K^b, un promotor activo en la mayoría de los tipos celulares que induce transformación. Sin embargo, estos ratones no producen tumores espontáneamente. Así, a la temperatura permisiva, el antígeno T está activado y las células derivadas de este ratón transgénico se comportan en cultivo como líneas celulares estables.

La línea celular BMC-9, derivada de un clon obtenido de la médula ósea del "Immortomouse", había dado buenos resultados de proliferación *in vitro* sobre soportes

de quitosano. Este material, a pesar de no haber mostrado una gran capacidad de promover la proliferación celular en los experimentos iniciales (capítulo 1) atribuida a la rugosidad del soporte, es un polisacárido biodegradable cuya capacidad como material biocompatible ha sido demostrada en numerosos estudios¹⁵⁷.

1.1. Producción de luz de las células BMC-9

Las células BMC-9 se marcaron con vectores lentivíricos para la expresión constitutiva de EGFP y Pluc como se ha explicado previamente y se seleccionó mediante FACS el 2% más fluorescente (G·Luc-BMC-9), que se caracterizó para la producción de luz. La figura 69 a muestra que cada célula produce 28,9 RLU (pendiente de la curva estándar). Para determinar la estabilidad de la expresión de los transgenes en este tipo celular, se siguió la producción de luz en un cultivo de G·Luc-BMC-9 durante 3 meses. Para ello se realizaron lisados celulares cada dos semanas en los que se midió el contenido de ADN y la actividad luciferasa. La gráfica de la figura 69 b muestra una tendencia a la disminución del Log (RLUs/ngDNA) frente al tiempo en el cultivo *in vitro*.

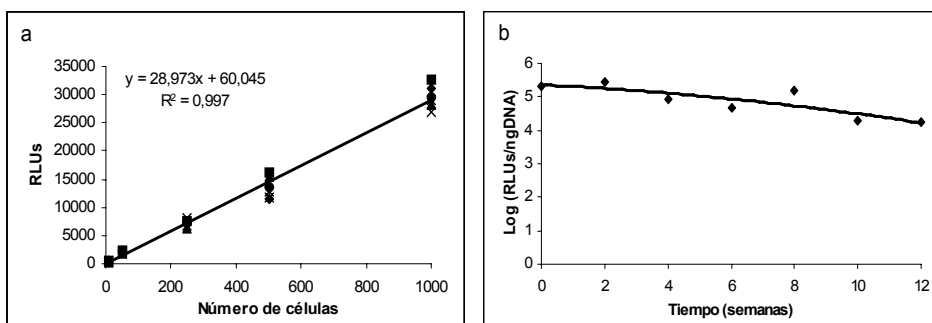


Fig. 69. Luminiscencia *in vitro* de las células G·Luc-BMC-9. Curva estándar de la capacidad de producción de luz de 10, 50, 250, 500 y 1000 células G·Luc-BMC-9 (a). La pendiente de la recta es el número de RLU/célula. R = coeficiente de correlación. Estabilidad de la expresión de PLuc en las células G·Luc-BMC-9 a lo largo de 12 semanas *in vitro* (b).

1.2. Proliferación de las G-Luc-BMC-9 *in vivo*

Con el fin de determinar el comportamiento *in vivo* de las células G-Luc-BMC-9, se sembraron $5 \cdot 10^5$ células del pase 9 en discos de quitosano. Después de una semana en cultivo, los discos sembrados se implantaron SC en 3 BALB/c nu/nu (3 discos por animal) y se siguió la proliferación celular mediante BLI. Como en casos anteriores se observó que durante la primera semana las células sufrieron una crisis de crecimiento que se remontó progresivamente hasta el final del experimento (Fig. 70 y 71).

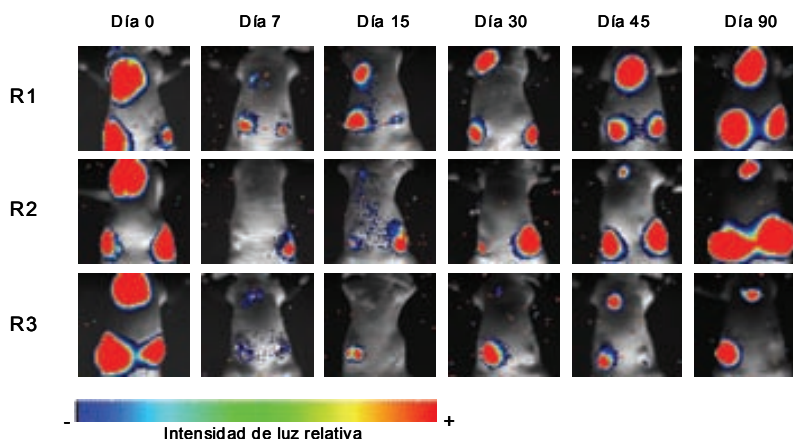


Fig. 70. Imágenes de BLI de los discos de quitosano sembrados con células G-Luc-BMC-9 e implantados subcutáneamente durante 90 días. La escala de color representa la intensidad relativa de la luz producida por las células (máxima intensidad=rojo, mínima=azul).

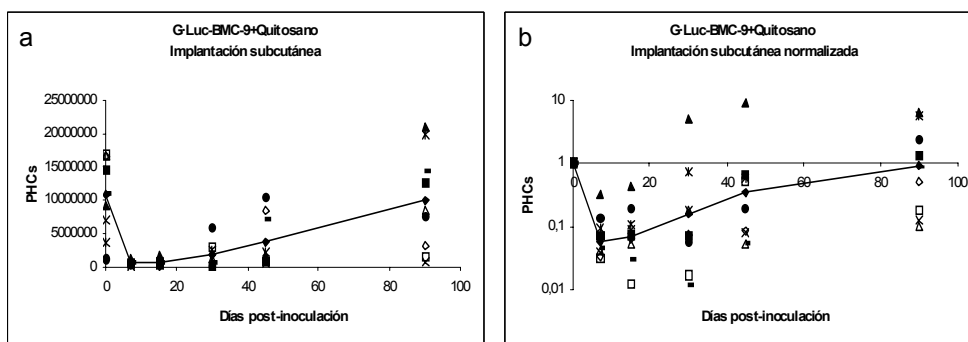


Fig. 71. Análisis del número de PHCs detectados en las imágenes de bioluminiscencia (Fig. 70). PHCs totales representados frente al tiempo post-inoculación (a). PHCs normalizados respecto a los PHCs detectados el día 0, representados frente al tiempo post-inoculación (b). La línea de cada gráfico representa la media de todos los implantes.

Entre las semanas 4 y 8, los ratones expulsaron 4 de los 9 implantes a través de la piel. El tejido cicatrizó posteriormente de forma espontánea. Entre las semanas 6 y 8 se observó que algunos implantes tenían el doble de volumen que al principio del experimento y que éste iba aumentando con el tiempo generando un crecimiento anormal semejante a un tumor.

1.3. Migración de las células implantadas

Al final de los 3 meses del seguimiento *in vivo*, se sacrificaron los animales y se aislaron diferentes órganos (bazo, hígado, pulmones, cerebro, costillas y ganglios). Se hicieron homogeneizados de estos tejidos y se midió la actividad luciferasa luminométricamente. No se detectó en ningún órgano un número de RLUs por encima del valor del blanco.



Fig. 72. Tumores observados en los ratones en los que se implantaron células G-Luc-BMC-9 sembradas en discos de quitosano, después de 90 días de la implantación.

1.4. Explantes

Para estudiar las células que constituían las tumoraciones alrededor del implante (Fig. 72), se hicieron explantes del tejido tumoral y se sembraron en placas de cultivo. Se observó que todos los explantes producían luz en presencia de luciferina (Fig. 73) y por consiguiente dicho crecimiento provenía de las células G-Luc-BMC-9 implantadas. Esto se comprobó en homogeneizados de diferentes muestras de los crecimientos

observados alrededor de los implantes al medir la actividad luciferasa luminométricamente, así se vió que 20 μ l de lisado producían un gran número de RLUs, concretamente entre $1,4 \cdot 10^6$ y $2,2 \cdot 10^6$ RLUs, correspondientes a un mínimo de 45.000 y 75.000 células respectivamente (Fig. 69).

Se aislaron células de los explantes y se expandieron, generando las células G-Luc-BMC-9 derivadas de explantes. Se observó que estas células tenían una tasa de crecimiento más elevada que las células G-Luc-BMC-9.

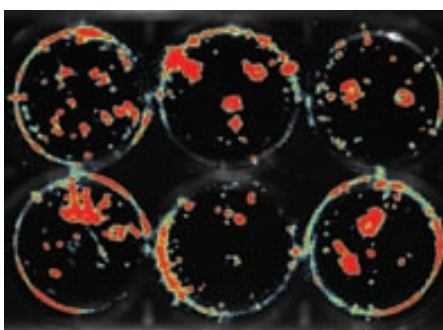


Fig. 73. Imagen de BLI de los explantes obtenidos de los tumores observados en los ratones. La imagen, tomada inmediatamente después de añadir la luciferina a la placa, se adquirió con binning 1X1 durante 5 minutos.

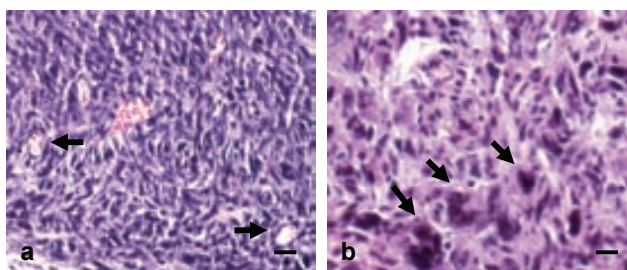


Fig. 74. Secciones de la masa celular formada alrededor de los implantes teñidas con HE. Se observaron vasos (a, flechas) en algunas secciones y núcleos de grandes proporciones (b, flechas) en la mayoría de las secciones. Escala: 25 μ m (a), 10 μ m (b).

1.5. Histología

Se aislaron muestras de la masa celular que rodeaba el implante y una vez lavadas se fijaron con PFA, se decalcificaron (ya que dicha masa tumoral tenía una estructura de apariencia calcificada) y se embebieron en parafina. La evaluación histológica de las secciones de parafina teñidas con HE (Fig. 74) reveló la existencia de sarcomas formados por células poco diferenciadas. Las características de las células neoplásicas incluían la presencia de figuras mitóticas aberrantes y atipia nuclear con núcleos de grandes proporciones (cariomegalia). Se observó también en diferentes cortes la presencia de vasos.

2. Análisis del potencial oncológico de las células BMC-9 *in vivo*

Aunque no se ha descrito que las células BMC-9 produzcan tumores, se ha sugerido que pequeños cambios en el nivel de expresión del gen tsA58 podrían alterar el crecimiento celular¹⁵⁸.

Según los resultados obtenidos con las células G-Luc-BMC-9, se quiso:

- Caracterizar las células BMC-9 y ver si realmente tenían un potencial oncológico y/o metastático.
- Investigar si el marcaje lentivírico podría haber provocado la transformación de dichas células.

2.1. Caracterización de las células BMC-9

Para comprobar si el marcaje lentivírico o la generación de tumores afectaba a la pluripotencialidad de las células BMC-9, se indujo mediante medios específicos la diferenciación *in vitro*, de células BMC-9, células G-Luc-BMC-9 y células G-Luc-BMC-9

derivadas de explantes, a cartílago, hueso y tejido adiposo. Se observó mediante tinciones específicas que los tres tipos celulares se diferenciaban a cartílago en un grado similar (Fig. 75 g-i). Sin embargo, las células BMC-9 mostraron mayor capacidad de diferenciación a hueso que las G·Luc-BMC-9 o las G·Luc-BMC-9 derivadas de explantes (Fig. 75 d-f). En cuanto a la diferenciación a tejido adiposo, ésta sólo fue positiva para las células BMC-9 (Fig. 75 a-c).

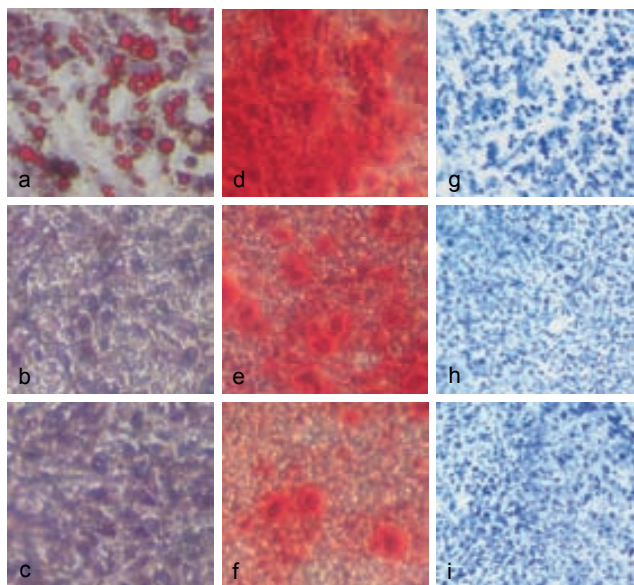


Fig. 75. Inducción a la diferenciación *in vitro* de las células BMC-9 (a, d, g), G·Luc-BMC-9 (b, e, h) y G·Luc-BMC-9 derivadas de explantes (c, f, i). Tratamiento de las células con medio adipogénico y tinción posterior con oil red O (a, b, c). Tratamiento de las células con medio osteogénico y tinción posterior con rojo de alizarina S (d, e, f). Formación de microprecipitado y tratamiento con medio condrogénico, tinción posterior con azul de toluidina (g, h, i). Objetivo 20X/0,5.

2.2. Potencial oncológico y/o metastático de las células

BMC-9

Para analizar el potencial oncológico y/o metastático de las células BMC-9, se inocularon SC e IM en ratones BALB/c nu/nu 10^5 células BMC-9, G·Luc-BMC-9 o G·Luc-BMC-9 aisladas de explantes.

La proliferación de las células G·Luc-BMC-9 y G·Luc-BMC-9 derivadas de explantes implantadas, se siguió mediante BLI. Los ratones en los que se inocularon células BMC-9 no marcadas se siguieron visualmente. Las células inyectadas SC (BMC-9, G·Luc-BMC-9 y G·Luc-BMC-9 derivadas de explantes) no proliferaron y desaparecieron entre las 3-4 semanas como ya se había observado anteriormente para otros tipos celulares (capítulo 1). Por el contrario, las células inyectadas IM proliferaron y formaron tumores visibles antes de los tres meses en todos los casos. Concretamente, las células G·Luc-BMC-9 derivadas de explantes formaron tumores intramusculares 3 semanas después de la inoculación, mientras que las células BMC-9 y G·Luc-BMC-9 tardaron entre 8 y 9 semanas en formar tumores visibles.

Al finalizar los 3 meses del experimento de implantación *in vivo*, se aislaron diferentes órganos (bazo, pulmones, cerebro, hígado, costillas y ganglios linfáticos), se hicieron homogeneizados de dichos órganos y se midió la actividad luciferasa luminométricamente. En ningún caso se observó la presencia de células luminiscentes, ya que en ninguna muestra las RLUs producidas fueron superiores a las del blanco.

Así, se comprobó que el marcaje con vectores lentivíricos, no es responsable de la formación de tumores, ya que las células no marcadas forman tumores al ser inyectadas IM. Por otra parte, se pudo comprobar que las células G·Luc-BMC-9 derivadas de explantes de tumores eran más eficaces que las células BMC-9 sin marcar o las G·Luc-BMC-9 en la formación de tumores, lo que sugiere que la implantación de las células promueve un proceso de oncogenización, quizás iniciado durante el cultivo de las células *in vitro*¹⁵⁹.

Por lo que se refiere al potencial metastático, en este modelo no se detectó metástasis a los órganos mencionados, por lo tanto podríamos pensar que estas células forman un sarcoma IM y no migran a otros órganos o tejidos.

La histología de los tumores formados IM mostró sarcomas con las mismas características que los observados SC al implantar células G·Luc-BMC-9 con el

soporte de quitosano. En los sarcomas IM se observó además la capacidad de de las células neoplásicas de invadir el tejido muscular adyacente (Fig. 76).

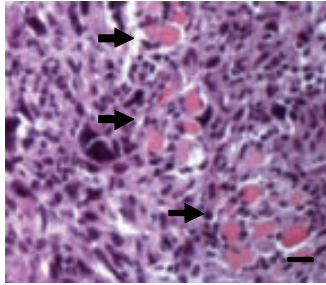


Fig. 76. Sección de un sarcoma intramuscular formado al inyectar células G-Luc-BMC-9 derivadas de explantes, teñido con HE. Las flechas indican las células neoplásicas que invaden el tejido muscular adyacente. Escala 10 μ m.

Discusión

El objetivo de esta tesis fue desarrollar una plataforma de imagen no invasiva basada en bioluminiscencia, asociada a un proyecto europeo de regeneración del tejido conjuntivo mediante técnicas de terapia celular. El cometido de la plataforma de imagen fue evaluar el comportamiento de diferentes tipos de biomateriales y células en animales. Esto se consideró necesario debido a que frecuentemente los procedimientos *in vitro* no proporcionan una información relevante sobre el comportamiento de biomateriales y células en un entorno fisiológico. Además, el seguimiento de la distribución, supervivencia, proliferación y diferenciación de las células implantadas es esencial para comprender su biología y bioseguridad. En estudios previos de comparación *in vivo* de diferentes tipos de materiales sembrados con células^{89,111}, la determinación del comportamiento celular se realizaba histológicamente al final de los experimentos y, como no se marcaban las células implantadas, era difícil discernir entre la contribución de las células sembradas y las células del huésped a la proliferación y diferenciación durante la formación de tejido nuevo.

La plataforma desarrollada consiste en:

- a) Transducir establemente las células utilizando vectores víricos, para la expresión constitutiva de la EGFP y la PLuc.
- b) Seleccionar la subpoblación celular de más alta expresión de las proteínas trazadoras mediante FACS.
- c) Sembrar las células marcadas en biomateriales.
- d) Implantar el biomaterial sembrado.
- e) Seguir el comportamiento del material sembrado *in vivo* mediante BLI durante un período de tiempo significativo.

La plataforma descrita se utilizó en dos etapas diferentes, una de selección, que consistía en implantar ectópicamente (SC e IM) biomateriales sembrados con células, con la que se pretendía evaluar de forma preliminar la eficacia de diferentes combinaciones de biomateriales y células, y una etapa de evaluación en un modelo de

lesión ósea, en la que se determinó la contribución de las mejores combinaciones obtenidas, en la etapa de selección, a la regeneración de este tejido.

Tipos celulares

- a) Células C3H/10T1/2. Esta línea embrionaria de ratón se utilizó en la etapa de selección debido a la facilidad en marcaje y la expansión celular. Además eran un buen modelo de MSCs ya que se diferenciaban a cartílago, hueso y tejido adiposo
- b) Células C57BL/6. Esta línea de fibroblastos embrionarios de ratón se utilizó en la etapa de selección por su fácil marcaje y expansión. Se sembraron en hidrogeles de RAD16-I, ya que se había descrito su proliferación y diferenciación a hueso, *in vitro*, en este material¹⁴⁴.
- c) Células BMC-9. Esta línea de médula ósea obtenida de un ratón transgénico para la construcción H-2K^b-tsA58 (Resultados: Capítulo III) se utilizó en la etapa de selección debido a resultados previos que habían demostrado su capacidad de proliferación en soportes de quitosano *in vitro*. Esta línea se diferencia a cartílago, hueso, músculo liso y tejido adiposo. Estas células dieron lugar a tumores tanto implantadas en soportes de quitosano como solas e independiente de marcaje. Se podría considerar este resultado como un “ejemplo modelo” de lo que podría ocurrir durante un proceso de terapia celular si inadvertidamente se incluyesen células transformadas, resultantes, por ejemplo, de su expansión *in vitro*.
- d) Células hMSCs. Las células mesenquimales humanas se utilizaron en la etapa de evaluación en un modelo de lesión ósea ya que serían probablemente las células de elección para la terapia celular de tejido conjuntivo en pacientes.
 - hBMSCs: células mesenquimales humanas de médula ósea. Se caracterizan por diferenciarse a cartílago, hueso y tejido adiposo. Su aislamiento conlleva

sufrimiento para el donante y un bajo rendimiento en la obtención de las células.

- hAMCSs: células mesenquimales humanas de lipoaspirado. Muestran unas características fenotípicas y de diferenciación muy similares a las hBMSCs, y por lo tanto son una alternativa a estas células para su aplicación médica. Además, su aislamiento es un proceso mucho más sencillo que en el caso de las hBMSCs y el rendimiento es muy superior.

Los dos tipos celulares utilizados, de médula ósea y tejido adiposo se marcaron con facilidad, se pudieron diferenciar a los linajes óseo y adiposo y mostraron el comportamiento proliferativo descrito en la literatura.

Sin embargo, no se utilizaron durante la etapa de selección debido a que siendo cultivos primarios, tienden a cambiar durante el período de expansión. Es más, sus características pueden depender del paciente del cual se han extraído.

Marcajes víricos

En las etapas iniciales de esta tesis se utilizaron vectores retrovíricos debido a que se había descrito ampliamente^{160,161} su eficacia en los marcajes celulares tanto *in vitro* como *in vivo*. Se observó que la utilización de vectores retrovíricos no afectaba al potencial de diferenciación ni inducía la transformación de las células marcadas, las C3H/10T1/2. Sin embargo, se detectó que células extraídas de los lugares de implantación, después de 12 semanas, presentaban una menor fluorescencia y bioluminiscencia que las células utilizadas para sembrar los biomateriales. Además, el seguimiento de un cultivo de G-Luc-C3H/10T1/2, durante 12 semanas *in vitro*, mostró que la expresión de Pluc disminuía considerablemente con el tiempo de cultivo. Por otra parte, los vectores retrovíricos sólo permiten el marcaje de células con una alta proliferación, como la mayoría de líneas celulares.

Debido a las variaciones en la expresión de los transgenes detectadas tanto *in vitro* como *in vivo* para los vectores retrovíricos^{158,162} y teniendo en cuenta que las MSCs

tienen una tasa de crecimiento baja, se decidió utilizar vectores lentivíricos para el marcaje de los demás tipos celulares utilizados en esta tesis. Este tipo de vectores permiten el marcaje de las células que se dividen activamente y de aquellas que tienen una tasa de proliferación más baja. Se observó que la utilización de los vectores lentivíricos no afectaba al potencial de diferenciación ni inducía la transformación de las células marcadas. Se detectó también la estabilidad en la expresión de los transgenes *in vitro*, a excepción de la línea celular BMC-9, que descendía ligeramente.

Detección de las células

Se realizaron curvas estándar *in vitro* para detectar la expresión de la PLuc en los cultivos celulares y se calculó el número de RLU/célula para cada tipo celular. La relación de RLU/célula en una suspensión permitía el cálculo del número de células presentes en los homogeneizados de los tejidos aislados de los animales.

Se realizaron también curvas estándar *in vivo*, para cada tipo celular (tabla 3), para poder relacionar los fotones detectados por bioluminiscencia con el número de células implantadas (PHCs/célula). Esta curva no se realizó para la línea celular BMC-9 debido a que se había observado previamente *in vitro* una disminución de la expresión de PLuc a lo largo del tiempo de cultivo y debido a que estas células formaban tumores rápidamente *in vivo*.

Tipo celular	PHCs/célula
G·Luc-C3H/10T1/2	23,4
G·Luc-C57BL/6	24,8
G·Luc-hAMSCs	137,3
G·Luc-hBMSCs	45,3

Tabla 3. PHCs/célula obtenidos *in vivo* para cada tipo celular.

Evidentemente, debido a que la absorción de luz por los tejidos depende de su densidad, grosor y color, esta curva estándar sería necesaria para cada localización de las células si se pretendiese hacer un estudio cuantitativo estricto.

Comportamiento de los biomateriales *in vitro* e *in vivo*

Los diferentes biomateriales utilizados mostraron comportamientos característicos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, se observó que ninguno de ellos producía una reacción de toxicidad sobre las células en cultivo.

- a) Hidrogel de gelatina-glutaraldehído. Este material se utilizó en la fase de selección de biomateriales. La degradación *in vitro* se produjo a la sexta semana de cultivo aproximadamente, por lo tanto, no se pudo detectar a nivel macroscópico al final de las 12 semanas de implantación. En este tiempo no se observó ninguna reacción inflamatoria ni de rechazo, aunque se detectó mediante técnicas histológicas la presencia de células mononucleares y linfocitos¹⁶³. Se detectó también la infiltración de células del huésped en hidrogeles de gelatina-glutaraldehído no sembrados^{134,164}.
- b) Hidrogel peptídico de RAD16-I. Este hidrogel se utilizó en la fase de selección de biomateriales. Mientras que en 16 semanas no se observó degradación *in vitro*, el material no se pudo detectar *in vivo* después de 2 semanas de implantación. No se observó ninguna reacción inflamatoria ni de rechazo macroscópicamente.
- c) *Biorubber*+RAD16-I. Se utilizó esta combinación, en la fase de selección de biomateriales, para obtener un soporte de mayor consistencia que el hidrogel RAD16-I. No se observó degradación del *biorubber* ni *in vitro* ni *in vivo*. No se observó ninguna reacción inflamatoria ni de rechazo macroscópicamente, aunque se detectó histológicamente la formación de una cápsula fibrosa¹¹².
- d) Hidrogel de PEG. Este hidrogel se utilizó en la fase de selección de biomateriales. *In vitro* su degradación se produjo durante la primera semana de

- cultivo e *in vivo* no se pudo detectar el material al final de las 12 semanas de implantación. No se observó ninguna reacción inflamatoria ni de rechazo macroscópicamente.
- e) Hidrogel de PEG-RGD. Este hidrogel se utilizó en la fase de selección y en la fase de evaluación en el modelo de lesión ósea. *In vitro* no se observó la degradación del material después de 16 semanas en cultivo, mientras que *in vivo* se detectó un cierto cambio de consistencia y una notable vascularización a las 12 semanas de implantación. No se observó ninguna reacción inflamatoria ni de rechazo macroscópicamente, aunque se detectó mediante técnicas histológicas la presencia de células mononucleares y linfocitos¹⁶³. Se detectó también la infiltración de células del huésped en hidrogeles de PEG-RGD sin sembrar^{134,164}.
- f) Esferas de alginato. Estas esferas se utilizaron en la fase de selección de biomateriales. *In vitro* se observó un cambio en la transparencia de las esferas durante las 16 semanas de cultivo, mientras que *in vivo* no se pudieron detectar a nivel macroscópico después de 12 semanas de implantación. No se observó ninguna reacción inflamatoria ni de rechazo macroscópicamente, aunque se detectó mediante técnicas histológicas la presencia de células mononucleares y linfocitos¹⁶³ en las zonas de implantación.
- g) Esferas CytodexTM3. Estas esferas se utilizaron en la fase de selección de biomateriales. No se observó degradación en la fase de cultivo *in vitro*, aunque *in vivo* no se pudieron detectar después de 12 semanas de implantación. No se observó ninguna reacción inflamatoria ni de rechazo macroscópicamente.
- h) Esferas PAMs. Estas esferas se utilizaron en la fase de selección de biomateriales. No se observó degradación en la fase de cultivo *in vitro*, aunque *in vivo* no se pudieron detectar después de 12 semanas de implantación. No se observó ninguna reacción inflamatoria ni de rechazo macroscópicamente.

- i) Soporte de quitosano. Este soporte se utilizó en la fase de selección de biomateriales. No se observó su degradación ni *in vitro* ni *in vivo*. *In vivo* se detectó una reacción de rechazo de los implantes en el 50-60% de los casos y una gran vascularización al sembrarse con células BMC-9. Histológicamente se detectó la presencia de células mononucleares y linfocitos¹⁶³.

FASE DE SELECCIÓN DE BIOMATERIALES

Inicialmente se realizó un análisis de la proliferación *in vivo* de las células G·Luc-C3H/10T1/2 sembradas en varios tipos de materiales: hidrogel de gelatina-glutaraldehído, hidrogel de PEG, hidrogel PEG-RGD, esferas de alginato, esferas de Cytodex™3, esferas PAMs y soporte de quitosano. Posteriormente, los buenos resultados *in vitro* de las células C57BL/6 en soportes peptídicos de RAD16-I nos llevaron a realizar, en colaboración con los grupos del Dr. Borrós IQS y el Dr. Semino MIT, el análisis *in vivo* de la proliferación de estas células sembradas en dos tipos de soportes, el hidrogel RAD16-I y el hidrogel RAD16-I+*bi rubber*.

Análisis con células G·Luc-C3H/10T1/2

Para analizar la proliferación *in vivo* de las células G·Luc-C3H/10T1/2 sembradas en biomateriales se utilizó un modelo ectópico que consistía en implantar los biomateriales sembrados IM y SC en ratones inmunodeprimidos y monitorizar el comportamiento de las células mediante un procedimiento de bioluminiscencia no invasivo.

Con esta metodología se pudieron detectar las células sembradas en los biomateriales implantados durante 3 meses. Se observó que las células G·Luc-C3H/10T1/2 sembradas mostraban una mayor proliferación en las implantaciones IM respecto a las SC. Concretamente, sólo se detectaron células en 4 de las 48 implantaciones SC realizadas, mientras que en 22 de las 48 implantaciones IM se detectaron células al

final de los 3 meses del período *in vivo*. Este podría ser uno de los motivos por los cuales en trabajos previos¹⁶⁵, en que implantaban SC materiales sembrados con células que expresaban establemente EGFP y Pluc, no se distinguía la señal de las células por bioluminiscencia a las 2 semanas de implantación.

Las células sembradas no se comportaron del mismo modo en todos los biomateriales utilizados, aunque se observó una evolución similar de las G-Luc-C3H/10T1/2 inoculadas sin soporte y las sembradas en hidrogel de PEG-RGD, esferas Cytodex™ 3 e hidrogel de gelatina-glutaraldehído, en estos casos las células pasaron una crisis de proliferación durante la primera semana y posteriormente volvieron a proliferar. La señal de las células implantadas se mantuvo más o menos estable para las células sin soporte y las sembradas en el hidrogel de gelatina-glutaraldehído, las esferas Cytodex™3 y las esferas de alginato, mientras que se observó una desaparición total de las células sembradas en el hidrogel de PEG, las esferas PAMs y el soporte de quitosano. Se observó que las células G·Luc-C3H/10T1/2, sembradas en el hidrogel de PEG-RGD, proliferaban significativamente ($p < 0,05$) comparadas con las sembradas en los demás biomateriales utilizados. La capacidad del hidrogel de PEG-RGD de inducir el crecimiento celular de las células G·Luc-C3H/10T1/2 se correlacionó con su asociación a los tejidos circundantes y con la presencia de vasos. Este material además fue el único que se detectó al final del experimento tanto IM como SC.

Análisis con células G·Luc-C57BL/6

Para analizar la proliferación *in vivo* de las células G·Luc-C57BL/6 sobre biomateriales se utilizó el modelo ectópico desarrollado para el análisis de la proliferación de las células G·Luc-C3H/10T1/2. Así se monitorizó el comportamiento IM y SC de las células G·Luc-C57BL/6 sembradas en el hidrogel peptídico RAD16-I o en el RAD16-I+*biorubber* mediante un procedimiento de BLI. Como ya se había descrito para las células G·Luc-C3H/10T1/2, se pudieron detectar las células sembradas en los biomateriales implantados durante 3 meses y se observó que las células G·Luc-

C57BL/6 sembradas mostraban una mayor proliferación en las implantaciones IM respecto a las SC. Así sólo se detectaron células en 1 de las 11 implantaciones SC de G·Luc-C57BL/6, mientras que en 7 de las 11 implantaciones IM se detectaron células al final de los 3 meses del período *in vivo*.

Como se había observado previamente, las células G·Luc-C57BL/6 sembradas no se comportaron del mismo modo en todos los biomateriales utilizados. Se detectó una tendencia al decrecimiento de la señal de las células inyectadas sin soporte, que sufrieron una crisis de proliferación durante la primera semana, y las sembradas en RAD16-I+*biorubber*. Sin embargo, se observó que las células G·Luc-C57BL/6 sembradas en el hidrogel de RAD16-I proliferaban significativamente ($p < 0,05$) comparadas con las células inyectadas sin soporte o sembradas en RAD16-I+*biorubber*.

Una cuestión importante en la utilización de células progenitoras para la regeneración de tejidos y en la aplicación de la terapia celular en general es el destino de las células implantadas. En los experimentos llevados a cabo dentro del modelo ectópico con los dos tipos celulares, G·Luc-C3H/10T1/2 y G·Luc-C57BL/6, se observó la desaparición celular de numerosas implantaciones, sobretodo SC, sugiriendo una posible migración de estas células. Sin embargo, no se detectaron otras zonas de producción de luz en los animales aparte de aquellas en las que se habían implantado materiales sembrados. Posteriores análisis luminométricos de homogeneizados de diferentes tejidos mostraron que no había actividad PLuc en el bazo, cerebro, hígado, huesos, pulmones o ganglios, después de 12 semanas de implantación, teniendo en cuenta el límite de detección de la técnica. En los ensayos luminométricos realizados es posible detectar un mínimo de 10 células marcadas en los ganglios y un mínimo de 50 células marcadas en el resto de los órganos.

FASE DE EVALUACIÓN EN UN MODELO DE LESIÓN ÓSEA

En esta fase se utilizó un modelo de lesión ósea en el hueso de la bóveda craneal para implantar hAMSCs y hBMSCs. Los objetivos de este modelo eran monitorizar de una forma no invasiva la proliferación de estos dos tipos de células progenitoras humanas sembradas en un biomaterial, el hidrogel de PEG-RGD, que previamente había demostrado la capacidad de promocionar la proliferación de la línea G-Luc-C3H/10T1/2¹⁴⁶ y la regeneración de tejido óseo¹³⁴, y monitorizar al mismo tiempo la regeneración del tejido óseo mediante el análisis de las lesiones por rayos X. Para alcanzar estos objetivos se marcaron las hAMSCs y las hBMCSs con un vector lentivírico para la expresión constitutiva de la EGFP y la PLuc, se seleccionaron y se sembraron en un hidrogel de PEG. Este hidrogel consistía en macrómeros de PEG de cuatro brazos, con péptidos RGD unidos covalentemente^{116,117}, unidos por péptidos que contenían una secuencia sensible a las MMPs flanqueada por dos cisteínas. La observación de los hidrogeles sembrados por microscopía confocal mostró que la distribución tridimensional de los dos tipos de MSCs en este biomaterial era muy similar.

Los hidrogeles de PEG-RGD sembrados con G-Luc-hAMCSs y G-Luc-hBMSCs se implantaron en defectos de 4 mm, realizados en el hueso de la bóveda craneal de ratones inmunodeprimidos BALB/c nu/nu, y se monitorizaron mediante un procedimiento de BLI durante 12 semanas. El análisis de las imágenes adquiridas mostró que las G-Luc-hBMSCs sobrevivían mejor que las G-Luc-hAMCSs al ser implantadas en esta localización. Se observó también que ambos tipos celulares siguieron un patrón de proliferación similar. Tanto las G-Luc-hAMCSs como las G-Luc-hBMSCs sembradas se caracterizaron por una crisis de crecimiento durante el primer mes a la que siguió una fase de estabilización en el número de células detectadas en los implantes. Sin embargo, mientras 7 de 10 implantes sembrados con G-Luc-hBMSCs emitían luz al final del experimento, sólo se detectaron 4 de 10 implantes sembrados con G-Luc-hAMCSs. La cuantificación de los fotones detectados en las

imágenes mostró que aproximadamente el 37% de las G·Luc-hBMSCs producían luz el día 90 post inoculación, mientras que la proporción de las G·Luc-hAMCSs inicialmente implantadas que habían sobrevivido era de un 5%. Estos datos sugieren que las hBMCSs serían más útiles que las hAMSCs en la regeneración del tejido óseo en este modelo y con el biomaterial de PEG-RGD. Sin embargo, es probable que utilizando otros materiales y aumentando el número de células sembradas inicialmente así como añadiendo determinados factores de crecimiento¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ se pudiera conseguir una mayor supervivencia de las hAMSCs sembradas en soportes e implantadas en el tejido óseo.

Para monitorizar de forma no invasiva la regeneración ósea se realizaron TACs de los animales al día siguiente de la operación, a la mitad y al final del experimento. Esta determinación indirecta de la regeneración ósea ya había sido utilizada previamente por otros grupos en modelos de reparación del tejido óseo femoral¹⁶⁹ y de la bóveda craneal¹³⁴. El análisis de las imágenes de rayos X realizadas mostró que en los defectos en los que se implantaron hidrogeles de PEG-RGD, independientemente de si habían sido sembrados con células o no, se producía un aumento de densidad significativamente ($p < 0,05$) superior al observado en los defectos control (sin implante). También se observaron diferencias, aunque menores ($p < 0,1$) entre el aumento de densidad de los defectos en que se implantaron hidrogeles de PEG-RGD sembrados o sin sembrar. No se observaron diferencias significativas entre las densidades de los defectos en los que se habían implantado hidrogeles PEG-RGD sembrados con G·Luc-hAMCS o con G·Luc-hBMSCs. Se observó un aumento en la densidad de los defectos en todos los grupos, incluido el grupo control, sin embargo, el aumento en la densidad del grupo control fue muy inferior al de los otros tres grupos y podría ser debido a la regeneración del periostio y a la formación de tejido fibroso.

El análisis histológico de los implantes mostró que se había producido mineralización en los hidrogeles de PEG-RGD sembrados con G·Luc-hAMCS o con G·Luc-hBMSCs, mientras que en los hidrogeles sin sembrar no se observaron depósitos de plata en la

tinción de Von Kossa. Por otra parte, en los hidrogeles de PEG-RGD sin sembrar implantados se observó la presencia de células del huésped en concordancia con datos previos^{134,164}. En experimentos posteriores con ratones transgénicos para la EGFP se comprobó esta colonización de los hidrogeles PEG-RGD por células del huésped, que a las 4 semanas tenían una morfología esférica mientras que a las 10 semanas su morfología era fibroblástica.

El análisis histológico de los defectos óseos mostró que en los defectos control no se había producido regeneración ósea aunque si se detectó la presencia de tejido fibroso como se había descrito previamente^{167,170}. En los defectos en que se implantó el hidrogel PEG-RGD con o sin células se observaron estructuras que se teñían de forma similar al tejido óseo aunque no se detectó claramente tejido óseo en los implantes, a pesar de que en diferentes trabajos se ha descrito la formación de tejido óseo *in vivo* en el hueso de la bóveda craneal utilizando hBMSCs^{171,172} o hAMSCs^{178,171,173} con diferentes tipos de materiales. La presencia de mineralización en los hidrogeles sembrados indica que probablemente, la utilización de factores como el BMP-2 o el ácido retinoico, el cambio de las condiciones de cultivo de las células antes de su sembrado e implantación¹⁷⁴ y el doble sembrado de hMSCs con otro tipo celular, como por ejemplo células endoteliales¹⁷⁵, habría conllevado una mayor estimulación de las hMSCs sembradas y de las células del huésped que invadieron el hidrogel provocando la formación de tejido óseo.

BIOSEGURIDAD

Las MSCs han sido derivadas a numerosos tipos celulares y utilizadas con éxito, en animales de experimentación, en la regeneración del tejido cartilaginoso y el tejido óseo entre otros. Sin embargo, frecuentemente los tratamientos basados en la terapia celular requieren la utilización de una cantidad de células progenitoras muy superior a la obtenida de los donantes, haciendo necesaria la expansión *in vitro* de estas células antes de su utilización terapéutica. Esta expansión puede conllevar daños en el

genoma de las células progenitoras, que podrían provocar su transformación oncogénica. Estudios recientes han descrito la formación de sarcomas en ratones inmunodeprimidos por la implantación de MSCs murinas^{83,84} o humanas^{176,177} aisladas de médula ósea y expandidas *in vitro*.

En los experimentos expuestos en el capítulo III, en los que se utilizaron células BMC-9 marcadas con vectores lentivíricos para la expresión de la EGFP y la Pluc (G-Luc-BMC-9) en combinación con un soporte de quitosano en un modelo ectópico SC en ratones inmunodeprimidos, se observó también la formación de sarcomas. La proliferación de las células G-Luc-BMC-9 se caracterizó por una crisis de crecimiento durante la primera semana seguida de una fase de proliferación exponencial.

Se comprobó, inyectando IM células sin marcar, marcadas y derivadas de los sarcomas formados, que la transformación observada no dependía de la transducción lentivírica, ya que los tres tipos celulares formaban sarcomas. Concretamente, se observó que tanto las BMC-9 como las G-Luc-BMC-9 formaban sarcomas en el mismo intervalo de tiempo. Sin embargo, sólo se detectaron sarcomas SC al implantar las G-Luc-BMC-9 sembradas en los soportes de quitosano.

El análisis luminométrico de homogeneizados de bazo, cerebro, hígado, huesos, pulmones y ganglios, de ratones que habían desarrollado sarcomas, en los que no se detectaron células G-Luc-BMC-9, descartó el potencial metastático de las estas células.

El análisis histológico de los sarcomas, tanto IM como SC, mostró la presencia de vasos así como una elevada concentración de células con núcleos de grandes proporciones. En el caso de los sarcomas IM se detectó además la capacidad de las células G-Luc-BMC-9 de invadir el tejido muscular¹⁷⁸.

“La vida es el arte de llegar a conclusiones a partir de evidencias insuficientes”

Samuel Butler.

Conclusiones

- Las células C3H/10T1/2, C57BL/6 y BMC-9 fueron marcadas establemente con la EGFP y la PLuc, seleccionadas y caracterizadas por su potencial de diferenciación como modelo de MSCs.
- Las células hAMSC y las hBMSC fueron marcadas establemente con la EGFP y la PLuc, seleccionadas y caracterizadas *in vitro*. Se comprobó previamente a su sembrado e implantación, en un modelo de lesión ósea, su capacidad de diferenciación a hueso.
- Se desarrollaron dos modelos animales, un modelo de implantación ectópica para seleccionar el comportamiento de combinaciones de biomateriales y tipos celulares en dos ambientes fisiológicos diferentes (IM y SC) y un modelo de lesión ósea en el hueso de la bóveda craneal para evaluar la proliferación y diferenciación de células hMSC de diferentes tejidos.
- En la fase de selección de materiales se observó, tanto para las G·Luc-C3H/10T1/2 como para las G·Luc-C57BL/6, que la proliferación celular era muy superior en las implantaciones IM comparadas con las implantaciones SC.
- Las células G·Luc-C3H/10T1/2 se mantuvieron estables *in vivo* al ser inyectadas sin soporte o sembradas en el hidrogel de gelatina-glutaraldehído, las esferas de alginato y las esferas CytodexTM3, dejaron de proliferar al ser sembradas en el hidrogel de PEG, las esferas PAMs y el soporte de quitosano y proliferaron significativamente al ser sembradas en el hidrogel PEG-RGD.
- Las células G·Luc-C57BL/6 dejaron de proliferar *in vivo* al ser inyectadas sin soporte o sembradas en el hidrogel RAD16-I+*bi rubber*, mientras que al ser sembradas en el hidrogel de RAD16-I proliferaron significativamente.
- En el modelo de lesión ósea, las G·Luc-hBMSCs subsistieron mejor que las G·Luc-hAMCS al ser sembradas en un hidrogel de PEG-RGD. Ambos tipos de implantes se mineralizaron pero no se detectó en ellos la formación de tejido óseo.

- El aumento de la densidad de los defectos óseos en los que se colocaron implantes, tanto sembrados con células como sin sembrar, fue significativamente superior al aumento de la densidad de los defectos control (sin implante).
- En el modelo de lesión ósea con ratones transgénicos para la EGFP se observó la migración de células del huésped a implantes del hidrogel de gelatina-glutaraldehído y del hidrogel de PEG-RGD.
- La implantación SC de células G·Luc-BMC-9 sembradas en soportes de quitosano produjo la formación de sarcomas. Éstos también se detectaron al inocular IM células BMC-9, G·Luc-BMC-9 y G·Luc-BMC-9 derivadas de sarcomas SC. No se detectaron metástasis a bazo, cerebro, ganglios, hígado, hueso o pulmones.
- Los procedimientos de BLI no invasiva desarrollados han permitido detectar un mínimo de 10^3 - $5 \cdot 10^3$ células *in vivo* dependiendo del tipo celular y seguir su proliferación durante un mínimo de 12 semanas.
- La plataforma descrita basada en procedimientos de BLI no invasiva ha demostrado ser una herramienta altamente útil para la selección de materiales y su evaluación en un modelo de lesión ósea *in vivo*.

Referencias

1. Organización Nacional de Transplantes. <http://www.ont.es>
2. Ministerio de Sanidad y Consumo. <http://www.msc.es>
3. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.
4. Informe de la salud laboral en España. <http://www.osl.upf.edu>
5. Integrated Project Genostem, Sixth European framework.
6. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002;359:1929-36.
7. Logeart-Avranglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005; 9:72-84.
8. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica, texto y atlas*, 5ª edición. Masson 2004.
9. Gurley AM, Roth SI. *Histology for Pathologists*. New York Raven Press, 1992.
10. Triffitt JT. The organic matrix of bone tissue. *Fundamental and Clinical Bone Physiology*. Lippincon 1980: 45-82.
11. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Biol* 2000;16:191-220.
12. Termine JD. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, second edition. New York Raven Press, 1993.
13. Glincher MJ. The nature of the mineral component of bone and mechanisms of calcification. *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. New York Raven Press, 1992: 265-86.
14. Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am* 1984;15:597-612.
15. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 1996; 45:371-86.
16. Escarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol.* 1983 Mar;96(3):639-43.

17. Recker RR. Embriology, anatomy, and microstructure of bone. Disorders of bone and mineral metabolism. New York Raven Press 1992:219-40.
18. Mauthews JL. Bone structure and ultrastructure. Fundamental and clinical bone physiology. Lippincon 1980:4-44.
19. Owen, M. Histogenesis of bone cells. Calcif. Tissue Res.1978; 25:205-207.
20. Marks, SC. The origin of osteoclasts: Evidence, clinical implications and investigative challenges of an extraskeletal source. J Oral Pathol. 1983; 12:226-256.
21. Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. J Cell Biol 1985;101:2210-22
22. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. Science 1989;245:855-7.
23. White MP, Murphy WA. Osteopetrosis and other sclerosing bone disorders. Metabolic bone diseases and clinically related disorders, second ed. Saunders 1990:616-58.
24. Young B, Heath JW. Histología funcional. Harcourt, Churchill livingstone, Elsevier 2004.
25. Martin RB, Burr DB. Structure, Function and Adaptation of Compact Bone. New York, Raven Press, 1989.
26. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. Instr Course Lect. 1987; 36:27-48.
27. Martin RB, Burr DB. Structure, function and adaptation of compact bone. New York Raven Press, 1989.
28. Rodan GA. Introduction to bone biology. Bone 1992;18:S3-S6.
29. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation. N Engl J Med 1988;809:29-35.

30. Wulthier RE. A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of cells, mitochondria and matrix vesicles. *Clin Orthop* 1982;169:219-42.
31. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 1989;240:270-80.
32. Singh I. The architecture of cancellous bone. *J Anat* 1978;127:305-10.
33. Cowin SC. Properties of cortical bone and theory of bone remodelling. *Biomechanics of diarthroidial joints*. Springer-Verlag 1990;2:119-53.
34. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption: a review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop* 1988;231:239-71.
35. Anderson HG. Calcification processes. *Pathol Annu* 1980;15:45-75.
36. Fischer LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem* 1983;258:12723-7.
37. Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chem* 2007;282:1193-204.
38. Midwest Orthopaedics at Rush. <http://www.rushortho.com>
39. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs* 2005;8(3):131-6.
40. Damien C, Parsons R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J of Applied Biomaterials* 1991;2:187-208.
41. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury, Int J Care Injured* 2005, 365:520-527.
42. Ross N, Tacconi L, Miles JB. Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting. *Br J Neurosurg* 2000;14:476-9.
43. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006;10(1):7-19.

44. McKee MS, Wild L, Waddell JP. The use of antibiotic-impregnated, bioabsorbable bone substitute in the treatment of infected long bone defects: results of a prospective trial. *J Orthop Trauma* 2000;14:137-8.
45. Parikh SN. Bone grafts substitutes in modern orthopedics. *Orthopedics* 2002;25:1301-11.
46. Chiroff RT, White EW, Weber KN, Roy DM. Tissue ingrowth of replamineform implants. *J Biomed Mater Res.* 1975;9:29-45.
47. Meadows GR. Adjunctive use of ultraporous beta-tricalcium phosphate void filler in spinal arthrodesis. *Orthopedics* 2002;25S:S579-84.
48. Gunzburg R, Szpalski M. Use of a novel beta-tricalcium phosphate-based bone void filler as a graft extender in spinal fusion surgeries. *Orthopedics* 2002;25S:S591-95.
49. Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:591-8.
50. Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material: a randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:495-502.
51. Tuli SM, Singh AD. The osteoinductive property of decalcified bone matrix. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br* 1978;60:116-23.
52. Fleming JE, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopaedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000;31:357-74.
53. Thorwarth M, Welhrman F, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Schlegel KA. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone* 2006; 38:30-40.
54. Kain MS, Einhorn TA. Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures. *Foot Ankle Clin* 2005; 4: 639-50.
55. Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol* 1999;1:E131-8.

56. Montjovent MO, Burri N, Mark S, Federici E, Scaletta C, Zambelli PY, Hohlfeld P, Leyvraz PF, Applegate LL, Pioletti DP. Fetal bone cells for tissue engineering. *Bone* 2004;35:1323-33.
57. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001;19:193-204.
58. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:435-62.
59. Lerou PH, Daley GQ. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 2005;19:321-31.
60. Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW. *Nat Biotechnol* 2004 Jan; 22:53-4.
61. Polak J, Hench L. Gene therapy progress and prospects: in tissue engineering. *Gene Ther* 2005;12:1725-33.
62. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
63. Bonnet D. Biology of bone marrow stem cells. *Clin Exp Med* 2003;3:140-9.
64. Friedenstein AJ, Chailakjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3:393-403.
65. Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* 2004;22:823-31.
66. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-13.

67. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-70.
68. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-49.
69. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42-48.
70. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11-20.
71. Zuk PA, Zhu M, Ashjian PA, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.
72. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:585-94.
73. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose Tissue-Derived Stromal Cells as a Novel Option for Regenerative Cell Therapy. *J Artheroscler Thromb* 2006;13:77-81.
74. Jahoda CAB, Whitehouse CJ, Reynolds AJ, Hole N. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp Dermatol* 2003;12:849-59.
75. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904.

76. Serafini M, Dylla SJ, Oki M, Heremans Y, Tolar J, Jiang Y, Buckley SM, Pelacho B, Burns TC, Frommer S, Rossi DJ, Bryder D, Gortari AP, O'Shaughnessy MJ, Holte MN, Fine GC, Weissman IL, Blazar BR, Verfaillie CM. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *JEM* 2007;204:129-39.
77. Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;22:617-24.
78. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003;121:368-74.
79. Romarov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003;21:105-110.
80. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008;451:345-9.
81. Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* 2007;25:707-11.
82. Correia AS, Anisimov SV, Li JY, Brundin P. Stem cell-based therapy for Parkinson's disease. *Ann Med* 2005;37:487-98.
83. Robinson AJ, Meedeniya AC, Hemsley KM, Auclair D, Crawley AC, Hopwood JJ. Survival and engraftment of mouse embryonic stem cell-derived implants in the guinea pig brain. *Neurosci Res* 2005;53:161-8.
84. Tolar J, Nauta AJ, Osborn M et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007;25:371-79.

85. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006;24:1095-1103.
86. Rubio D, García-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005;65:3035-39.
87. Vilalta M, Degano IR, Bago J, Gould D, Santos M, García-Arranz M, Ayats R, Fuster C, Chernajovsky Y, García-Olmo D, Rubio N, Blanco J. Biodistribution, long term survival and safety of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence Imaging. *Stem Cells Dev.* In press.
88. Kleinman HK, Phillip D, Hoffman MP. Role of extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:526-32.
89. Jansen JA, von Recum AF, van der Waerden JP, de Groot K. Soft tissue response to different types of sintered metal fibre-web materials. *Biomaterials* 1992;13:959-68.
90. Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Ectopic bone formation in rat marrow stromal cell/titanium fiber mesh scaffold constructs: effect of initial cell phenotype. *Biomaterials* 2005;26:6208-16.
91. Lee YM, Seol YJ, Lim YT, Kim S, Han SB, Rhyu IC, Baek SH, Heo SJ, Choi JY, Klokkevold PR, Chung CP. Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices. *J Biomed Mater Res* 2001;54:216-23.
92. Vogel P, Wange P, Hartmann P. Phosphate glasses and glass-ceramics for medical applications. *Glasstech Ber Glass Sci Tech* 1997;70:220-26.
93. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Cer Soc* 1991;74:1487-510.
94. Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials* 2007;28:1653-63.

95. Maquet V, Jerome R. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Mater. Sci. Forum* 1997;250:15-42.
96. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2004;32:477-86.
97. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 2005;26:433-41.
98. Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog Mat Sci* 2001;46:273-82.
99. Ye Q, Zünd G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, Hubbell JA, Turina M. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17:587-91.
100. Schmökkel HG, Weber FE, Seiler G, Von Rechenberg B, Schense JC, Schawalder P, Hubbell J. Treatment of nonunions with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered from a fibrin matrix. *Vet Surg* 2004;33:112-8.
101. Habraken WJ, Wolke JG, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:234-48.
102. Vlierberghe SV, Cnudde V, Dubruel P, Masschaele B, Cosijns A, Paepe ID, Jacobs PJ, Hoorebeke LV, Remon JP, Schacht E. Porous gelatine hydrogels :1. Cryogenic formation and structure analysis. *Biomacromolecules* 2007;8:331-7.
103. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatine scaffolds. *Biomaterials* 2004;25:3211-3222.
104. Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stems cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res* 2000;52:246-55.
105. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res* 1999;17:205-213.

106. Gutowska A, Jeong B, Jasionowski M. Injectable gels for tissue engineering. *Anat res* 2001;263:342-9.
107. Puhl W, Scharf P. Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:637-40.
108. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Recon Surg* 1991;88:753-58.
109. Wang L, Shelton RM, Cooper PR, Lawson M, Triffitt JT, Barralet JE. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:3475-3481.
110. Matthew IR, Browne RM, Frame JW, Millar BG. Subperiosteal behavior of alginate and cellulose wound dressing materials. *Biomaterials* 1995;6:275-8.
111. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 2000;51:586-95.
112. Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:3919-3928.
113. Day RM, Boccaccini AR, Maquet V, Shurey S, Forbes A, Gabe SM, Jerome R. In vivo characterisation of a novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:729-34.
114. Sawyer AJ, Piepmeier JM, Saltzman WM. New methods for direct delivery of chemotherapy for treating brain tumors. *Yale J Biol Med* 2006;76:141-52.
115. Wu Y, Shaw S, Lin H, Lee T, Yang C. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials* 2006;27:896-904.
116. Taite LJ, Rowland ML, Ruffino KA, Smith BR, Lawrence MB, West JL. Bioactive hydrogel substrates: probing leukocyte receptor-ligand interactions in parallel plate flow chamber studies. *Ann Biomed Eng* 2006;34:1705-11.

117. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly(ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition. *Biomacromolecules* 2003;4:713-22.
118. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, Hubbell JA. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5413-8.
119. Estrada C, Paz AC, Lopez LE. Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Colombia. *Revista EIA* 2006;5:93-100.
120. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004;22;80-6.
121. Battista S, Guarnieri D, Borselli C, Zeppetelli S, Borzacchiello A, Mayol L, Gervasio D, Keene DR, Ambrosio L, Netti PA. The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation. *Biomaterials* 2005;26:6194-6207.
122. Mauney JR, Jaquiéry C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL. In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:3173-3185.
123. Anderson DG, Levenberg S, Langer R. Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery. *Angewandte Chemie-International Edition* 2003;42:3153-8.
124. Anderson DG, Putman D, Lavik EB, Mahmood TA, Langer R. Biomaterial microarrays: rapid, microscale screening of polymer-cell interaction. *Biomaterials* 2005;26:4892-7.
125. Anderson DG, Levenberg S, Langer R. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:863-6.

126. Bailey SN, Sabatini DM, Stockwell BR. Microarrays of small molecules embedded in biodegradable polymers for use in mammalian cell-based screens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;16:16144-9.
127. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:634-40.
128. Cao YA, Bachmann MH, Beilhack A, Yang Y, Tanaka M, Swijnenburg RJ, Reeves R, Taylor-Edwards C, Schulz S, Doyle TC, Fathman CG, Robbins RC, Herzenberg LA, Negrin RS, Contag CH. Molecular imaging using labeled donor tissues reveals patterns of engraftment, rejection, and survival in transplantation. *Transplantation* 2005;80:134-9.
129. Massound TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003;17:545-80.
130. Iris B, Zilberman Y, Zeira E, Galun E, Honigman A, Turgeman G, Clemens T, Gazit Z, Gazit D. Molecular imaging of the skeleton: quantitative real-time bioluminescence monitoring gene expression in bone repair and development. *J Bone Miner Res* 2003;18:570-8.
130. Pineda JR, Rubio N, Akerud P, Urban N, Badimon L, Arenas E, Alberch J, Blanco J, Canals JM. Neuroprotection by GDNF-secreting stem cells in a Huntington's disease model: optical neuroimage tracking of brain-grafted cells. *Gene Ther* 2007;14:118-28.
131. Koo V, Hamilton PW, Williamson K. Non-invasive in vivo imaging in small animal research. *Cell Oncol* 2006;28:127-39.
132. Miletic H, Fischer Y, Litwak S, Giroglou T, Waerzeggers Y, Winkeler A, Li H, Himmelreich U, Lange C, Stenzel W, Deckert M, Neumann H, Jacobs AH, von Laer D. Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene. *Mol Ther* 2007;15:1373-81.
133. Ottobrini L, Ciana P, Biserni A, Lucignani G, Maggi A. Molecular imaging: a new way to study molecular processes in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 2006;26:69-75.

134. Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Müller R, Hubbell JA. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol* 2003;21:513-8.
135. Kaneko K, Yano M, Yamano T, Tsujinaka T, Miki H, Akiyama Y, Taniguchi M, Fujiwara Y, Doki Y, Inoue M. Detection of peritoneal micrometastases of gastric carcinoma with green fluorescent protein and carcinoembryonic antigen promoter. *Cancer Res* 2001;61:5570-5574.
136. Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Li L, Geller J, Moossa AR, Hoffman RM. Real-time whole-body imaging of an orthotopic metastatic prostate cancer model expressing red fluorescent protein. *Prostate* 2005;62:374-79.
137. Wilson T, Hastings JW. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:197-230.
138. Loening AM, Wu AM, Gambhir SS. Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. *Nature methods* 2007;4:641-43.
139. Zhao H, Doyle TC, Coquoz O, Kalish F, Rice BW, Contag CH. Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissues determine the sensitivity of detection in vivo. *J Biomed Opt* 2005;10:41210.
140. Wu JC, Sundaresan G, Iyer M, Gambhir SS. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* 2001;4:297-306.
141. Honigman A, Zeira E, Ohana P, Abramovitz R, Tavor E, Bar I, Zilberman Y, Rabinovsky R, Gazit D, Joseph A, Panet A, Shai E, Palmon A, Laster M, Galun E. Imaging transgene expression in live animals. *Mol Ther* 2001;4:239-49.
142. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;272:263-67.
143. Blesch A. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods* 2004;33:164-72.

144. Garreta E, Genové E, Borrós S, Semino CE. Osteogenic differentiation of Mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold. *Tissue Eng* 2006;12:2215-27.
145. Srouji S, Livne E. Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev* 2005;126:281-7.
146. Srouji S, Blumenfeld I, Rachmiel A, Livne E. Bone defect repair in rat tibia by TGF- β 1 and IGF-1 released from hydrogel scaffold. *Cell Tissue Bank* 2004;5:223-30.
147. Semino CE, Merok JR, Crane GG, Panagiotakos G, Zhang S. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation* 2003;71:262-70.
148. Tatard VM, Venier_Julienne MC, Saulnier P, Prechter E, Benoit JP, Menei P, Montero-Menei CN. Pharmacologically active microcarriers: a tool for cell therapy. *Biomaterials* 2005;26:3727-37.
149. Correlo VM, Pinho ED, Pashkuleva I, Bhattacharya M, Neves NM, Reis RL. Water absorption and degradation characteristics of chitosan-based polyesters and hydroxyapatite composites. *Macromol Biosci* 2007;8:354-63.
150. Pavlov MP, Mano JF, Neves NM, Reis RL. Fibers and 3D scaffolds from biodegradable starch-based blends: production and characterization. *Macromol Biosci* 2004;4:776-84.
151. Hansen CT. The nude gene and its effects (1-35) in The nude mouse in experimental and clinical research. Ed. Fogh J, Giovanella BC. New York Academic Press 1978.
152. Aalami OO, Nacamuli RP, Salim A, Fong KD, Lenton KA, Song HM, Fang TD, Longaker MT. Differential transcriptional expression profiles of juvenile and adult calvarial bone. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115:1986-94.
153. García R. Laboratorio de anatomía patológica, primera edición, Interamericana-McGraw-Hill 1993.

154. Krishnan M, Park JM, Cao F, Wang D, Paulmurugan R, Tseng JR, Gonzalzo ML, Gambhir SS, Wu JC. Effects of epigenetic modulation on reporter gene expression: implications for stem cell imaging. *FASEB J* 2006;20:106-8.
155. Roman I, Vilalta M, Rodriguez J, Matthies AM, Srouji S, Livne E, Hubbell JA, Rubio N, Blanco J. Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by in vivo non-invasive photonic imaging. *Biomaterials* 2007;28:2718-28.
156. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999;14:700-9.
157. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Ann Rheum Dis* 2008;67:288-95.
158. Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2K^b-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5096-5100.
159. Tolar J, Nauta AJ, Osborn M et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007;25:371-379.
160. El Hilali N, Rubio N, Blanco J. Different effect of paclitaxel on primary tumor mass, tumor cell contents, and metastases for four experimental human prostate tumors expressing luciferase. *Clin Cancer Res* 2005;11:1253-8.
161. El Hilali N, Rubio N, Blanco J. Noninvasive in vivo body luminescent análisis of luciferase labelled orthotopic próstate tumours. *Eur J Cancer* 2004;40:2851-8.
162. Rosenqvist N, Hard AS, Samuelsson C, Johansen J, Lundberg C. Activation of silenced transgene expression in neural precursor cell lines by inhibitors of histone deacetylation. *J Gene Med* 2002;4:248-57.
163. Xia Z, Ye H, Choong C, Ferguson DJ, Platt N, Cui Z, Triffitt JT. Macrophagic response to human mesenchymal stem cell and poly(epsilon-caprolactone) implantation in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *J Biomed Mater Res A* 2004;71:538-48.

164. Whitlock PW, Smith TL, Poehling GG, Shilt JS, Van Dyke M. A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon and ligament regeneration. *Biomaterials* 2007;28:4321-9.
165. Blum JS, Temenoff JS, Park H, Jansen JA, Mikos AG, Barry MA. Development and characterization of enhanced green fluorescent protein and luciferase expressing cell line for non-destructive evaluation of tissue engineering constructs. *Biomaterials* 2004;25:5809-19.
166. Seol YJ, Kim KH, Park YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Lee SJ, Han SB, Chung CP. Osteogenic effects of bone-morphogenetic-protein-2 plasmid gene transfer. *Biotechnol Appl Biochem* 2008;49:85-96.
167. Aghaloo TL, Amantea CM, Cowan CM, Richardson JA, Wu BM, Parhami F, Tetradis S. Oxysterols enhance osteoblast differentiation in vitro and bone healing in vivo. *J Orthop Res* 2007;25:1488-97.
168. Wan DC, Siedhoff MT, Kwan MD, Nacamuli RP, Wu BM, Longaker MT. Refining retinoic acid stimulation for osteogenic differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Tissue Eng* 2007;13:1623-31.
169. Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Betz O, Merkle HP, Hilbe M, von Rechenberg B, MsCool J, Abrahamsen L, Nazarian A, Cory E, Curtis M, Kaplan D, Meinel L. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone* 2007;41:247-55.
170. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Kassolis JD, Prasad HS, Rohrer MD. Calcium sulphate-carboxymethylcellulose bone graft binder: Histologic and morphometric evaluation in a critical size defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;83:451-8.
171. Castano-Izquierdo H, Alvarez-Barreto J, van den Dolder J, Jansen JA, Mikos AG, Sikavistas VI. Pre-cultured period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential. *J Biomed Mater Res A* 2007;82:129-38.

172. Cowan CM, Aalami OO, Shi YY, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Nacamuli RP, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment. And bone turnover. *Tissue Eng* 2005;11:645-58.
173. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004;22:560-7.
174. Sikavitsas VI, van den Dolder J, Bancroft GN, Jansen JA, Mikos AG. Influence of the in vitro culture period on the in vivo performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:645-58.
175. Kaiger D, Krebsbach PH, Wang Z, West ER, Horger K, Mooney DJ. Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration. *J Dent Res* 2006;85:633-7.
176. Rubio D, García-Castro J, Martín MC et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005;65:3035-3039.
177. Burns JS, Abdallah BM, Guldberg P et al. Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 2005;65:3126-3135.
178. Zhou YF, Bosh-Marce M, Okuyama H, Krishnamachary B, Kimura H, Zhang L, Huso DL, Semenza GL. Spontaneous transformation of cultures mouse bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res* 2006;66:10849-54.

Abatido, mirando al cielo,
tras la tormenta,
en el silencio...
Esperaba la muerte
que alcanzó a otros primero.
Y recordó las personas,
los momentos y los sueños,
que le llenaron la vida,
y transformaron en un cuento,
la locura de su huida.
Y cerró los ojos,
y miró dentro,
y se sintió repleto de esos momentos.
Se serenó y pensó feliz
que había vivido el dolor y lo bello!
Que la alegría le acompañó cual gemelo!
Y que morir era sólo otro cuento.

Agradecimientos

El primer lugar en los agradecimientos se lo ha ganado mi familia por derecho propio. Y no sólo porque mis padres me trajeran a esta vida (o me recogisteis de unos titiriteros?!), si no por el apoyo, las risas, los ágapes, por ser los mejores secretarios del mundo, los chóferes más divertidos e infinidad de cosas que seguro no recuerdo. Tiene que quedar claro que todas estas funciones las han desempeñado a la perfección tanto mis padres, como mi hermano y mi abuelo (y Lela en el pasado). Así que gracias una vez más, esta tesis es en parte vuestra.

El segundo lugar es para mis jefes, los doctores Jerónimo Blanco y Nuria Rubio, que además de haber sido mis guías científicos en estos últimos 3 años y pico se han convertido casi en mi segunda familia junto con el resto de los integrantes de “Wizards of Light”: Marta, Juli y la recién llegada Eli. Ha sido realmente estimulante trabajar con vosotros y discutir los experimentos y resultados en tan buen ambiente.

En tercer lugar quiero dar un agradecimiento especial a todos los que me han ayudado y han colaborado científicamente conmigo en el desarrollo de esta tesis. Quiero agradecer a los grupos de los doctores C.N. Montero-Menei (Angers, Francia), E. Livne (Haifa, Israel), H.A. Papadaki (Heraklion, Grecia), J.A. Hubbell (Lausanne, Suiza), N.M. Neves (Braga, Portugal) y P. Charbord (Tours, Francia) el suministro de materiales y células para los experimentos. También a los grupos de los doctores P. Bianco (Roma, Italia), J.A. Hubbell y G. Gross (Braunschweig, Alemania) la calurosa acogida en sus laboratorios y lo provechosos que fueron los días que estuvimos allí. Por último agradecer a aquellos como Lluís Quintana y Elena Garreta que han trabajado conmigo codo con codo y han pasado horas conmigo y los ratones (a parte de mis compañeros de grupo), a los responsables del tomógrafo del Hospital Clínic Veterinari de Bellaterra sin los cuales no hubiera podido hacer los tacs, a Jaume Comas del Parc Científic por seleccionarme las células más fluorescentes del mundo y a Esther Peña por ayudarme con el

confocal. Quiero agradecer también a Alan Boyle y a la Sociedad Inglesa de Investigación en el tejido óseo la fotografía del fondo de la portada de esta tesis.

A partir de este punto voy a seguir un método más o menos cronológico porque sino, con lo que yo tiendo a la dispersión literaria, esto se va a embarullar más de lo irremediable.

Antes de llegar al mundo de la biología y adentrarme en la ciencia, recorrí ese camino de guardería y colegio que prácticamente todos hemos sufrido. De toda aquella época, de la que guardo una gran variedad de recuerdos, aún conservo a algunas personas que me han acompañado desde entonces. Cris, Palos o como quieras llamarla es una de las mejores y más antiguas amistades que conservo, es difícil precisar en que momento del colegio empezamos a ser amigas pero espero que sigamos siéndolo por mucho tiempo (quiero decirte que me alegro enormemente de la felicidad que ahora te embarga y que seguro que toda empresa que te propongas será un éxito!). De aquella época también conservo a Sonia que, a pesar de ser a veces como los ojos del Guadiana, es una gran persona y una compañía muy agradable para tomar unas cervezas y perder al billar. Al alternar con Sonia acabé conociendo a Javi, su novio avulense, un chico muy simpático y que la quiere con locura, espero que con lo que os gusta viajar vengáis a verme allí donde me mude! No puedo olvidarme en este grupo de Laia, una de las personas con más tesón que conozco – estic segura que els teus esforços hauran valgut la pena i que tot sortirà bé en aquesta nova etapa – ni de Montse Llorc, cuya localización después de unos años de ausencia me ha producido gran alegría.

Después del colegio y la selectividad llegué a la facultad de Biología de la UB, allí conocí a gente variopinta y aumenté mis conocimientos a la par que mi vida social! De aquella etapa un abrazo especial para Ana que, además de hacer los chales

más bonitos del mundo, ha sido siempre “divina de la muerte” con su lava, lava y su cuelga, cuelga entre otros muchos vocablos que yo he incorporado a mi forma de hablar! Aunque nos veamos de vez en cuando es muy agradable charlar un rato contigo y saber de tí. No quiero olvidarme del resto de los integrantes de las cenas uni: Juan y sus divertidos comentarios odontólogos – y es que a este chico ya se veía que lo de la biología no le iba-, Anabel y sus “gritos” –siempre recordaré aquello de que Jose no era tu novio!!!-, Javi “el bombero más dicharachero”, que ha resultado muy sensato al buscarse un trabajo bien remunerado, Klaas, que a pesar de estar como una cabra en la carrera tiene un trabajo y una vida personal estable junto a una excompañera del colegio (Montse C) – siempre me sentiré orgullosa de haber sido vuestra Celestina!- y Mire que a pesar de haber estudiado un montón de cosas y ser una comercial en auge no ha dejado de ser tan divertida como antaño. Mire me lleva a recordar a la gente de las otras cenas uni: Mercè, Miguel, Sara, Marc, Eli... con algunos de ellos y Ana hemos disfrutado de momentos de risas en varios países (que grande fue cantar en la plaza Damm con “el Carlitos”). Amb la Eli vam començar després a viure en un pis compartit on hem viscut també moltes coses que recordo amb carinyo.

El último año de carrera, empecé a plantearme seriamente la idea de hacer una tesis. Y es que lo que yo creía entonces que era la ciencia me parecía una forma fantástica de ganarme la vida, aunque ahora esta frase pueda parecer absurda! Como me gustaba la genética decidí ir a ese departamento en busca de alguien que me introdujera en el mundo científico, así es como conocí al Dr. Bueno y a su grupo. Tengo que reconocer que esos 6 meses fueron muy divertidos junto a Juani, Miquel (nunca olvidaré la frase “elles les més belles” refiriéndose a las planarias claro!), Víctor, Albert, Jordi y los demás integrantes del laboratorio. Durante esta breve estancia en el departamento de genética aprendí a moverme en un laboratorio, a pelearme con un micrótopo de parafina del año 3 a.C. y a sudar dignamente a 40° C (suerte que existía una cámara de 4° C que sino

hubiéramos muerto!). Como mi entonces jefe no tenía dinero (que fenómeno tan extraño, eh?!) y la idea de pasarme la mitad del año en Valladolid no me seducía nada empecé a buscar otro lugar. Esta tarea no resultó demasiado fácil teniendo en cuenta que mi expediente académico no era algo espectacular.

Entre entrevista y entrevista acabé aterrizando en la Unitat de Biofísica de la facultad de Medicina de la UAB. Del día en que conocí al que sería mi jefe durante un año, el Dr. Joan Manyosa, sólo recuerdo a un tío rubio, alto, con una camiseta blanca y pinta de guiri que levantaba un cultivo de 20 litros que olía fatal! Me acabé decidiendo por la rhodopsina en Biofísica porque era lo único que empezaba en aquel instante y los que me conocéis ya sabéis que debido a la hiperactividad congénita que sufro no puedo estar sin hacer nada! Científicamente aquel año fue duro porque yo era la única integrante del grupo, no tenía la menor idea de técnicas biofísicas y los protocolos existentes eran...digamos que peculiares. Afortunadamente los becarios/as (y otros más mayores) allí presentes me ayudaron muchísimo (Álex, Julio, Imma, Marta C, Pep, David García-Q...) y gracias a ellos aprendí un montón de cosas de bacterias, cultivos celulares, PCRs y espectroscopías varias. Aparte del aspecto científico tengo que destacar el personal, nunca olvidaré las confesiones en el cuarto de cultivos con Marta C, Imma (fa massa temps que no ens veiem) y Álex, las juergas que nos montamos en Bóveda (ya desaparecido) y otros lugares con billares (imposible olvidar la noche Julio-Álex-Irene que los mozos terminaron con cervezas de lata y gafas de bucear!). La estancia en el despacho de becarios la hicieron especialmente agradable Marta C (tita Marta) y Rosana, siempre con un humor ácido pero genial. Quiero decirle a la recién doctorada Marta C lo mucho que la envidio (sanamente) en este momento y que se prepare a ayudarme con el papeleo de mi tesis y a Rosana que no podré agradecerle suficiente el haberme echo de sherpa de libros de estadística este último año! Recuerdo también con cariño las charlas con Xavi

durante las prácticas de biofísica y física médica, y es que el tener un compañero divertido en aquel aburrimiento diario evitó mi suicidio! Quiero mandarles un beso a Elodia y Mercè que siempre echaban una mano.

Pero si tengo que destacar una cosa sobre todas las demás de la estancia en Biofísica es sin lugar a dudas el haber conocido a aquel chico alto, rubio y con pinta de guiri que recuerdo del primer día. Y es que quien me iba a decir a mí –y a mi entonces agitada vida sentimental- que conocería entre cafés y observación de cristales de rodopsina al chico de mi vida! Alguien que no sólo demostró su gran valía en lo profesional sino también en lo personal con una tendencia inevitable a ayudar a todo aquel que lo necesitara. Así que definitivamente sólo por conocer a Álex (que es el nombre del que parecía un guiri) y a los demás que se han acabado convirtiendo en mis amigos valió la pena estar un año rodeada de libretas ininteligibles!

Durante los últimos meses de mi estancia en Biofísica, por la primavera-verano del 2004, empecé a buscar otro sitio donde hacer la tesis. Hice algunas entrevistas y finalmente el 9 de setiembre del 2004, me acuerdo porque es el día de mi cumpleaños no porque tenga una memoria portentosa (que también!), recibí una llamada del Dr. Jerónimo Blanco ofreciéndome formalmente una beca predoctoral. Este fue definitivamente un muy buen regalo de cumpleaños! Aquella mañana después de la llamada telefónica tuve que empezar a pensar como le decía a mi todavía jefe que me iba, esto puede parecer muy sencillo pero yo estaba al borde del ataque de ansiedad. En esas condiciones anímicas conocí a Arturo, Aída y Sylvia (amigos de Álex) que seguro debieron pensar que me faltaban varios tornillos! Con ellos empezaron unas cenas a 5, que luego fueron a 4 cuando Álex se marchó a Estocolmo y más tarde a 2 (al irse Arturo y Aída a Toronto) cuando sólo quedamos Sylvia y yo en Barcelona. Ya hace un año que Sylvia se fue a Utrech y claro está yo no voy a cenar sola! Quiero enviarles un abrazo muy fuerte a los 3 porque lo cierto es que aquellas eran unas cenas muy agradables y se les

hecha de menos. Volvamos al tema, después de la comida con Álex y sus amigos fui a hablar con el Dr. Joan Manyosa y la verdad es que todo acabó resultando mucho más sencillo de lo que había pensado y finalmente el día 1 de octubre empezaba a trabajar en el Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC) en el Hospital de Sant Pau.

Cuando aterricé en el ICCC en el grupo del Dr. Jerónimo Blanco, además de él había una postdoc semi-codirectora semi-secretaria general del grupo llamada Nuria Rubio y una doctoranda rebotada del mundo vegetal llamada Marta Vilalta. Aunque Jerónimo y Nuria asustaban un poco en la entrevista haciéndote traer todas las libretas y preguntándote casi donde hiciste la primera comunión, resultaron ser unos muy buenos jefes que me han ayudado en todo momento. La verdad es que, cuando llegué al ICCC no tenía la menor intención de hacer amistades, y ahora no penséis que soy una borde (vale, un poco sí!), pero es que consideraba que con los de la UAB y anteriores ya tenía suficiente y que yo allí había ido a trabajar. El caso es que como dicen el roce hace el cariño y teniendo en cuenta que compartía el laboratorio con Marta V como único ser vivo (además de los tronquitos, pero ellos no hablan!) pues el trabajar codo con codo y cantar los éxitos de M80 hizo que Marta V se convirtiera en una de mis mejores amigas. – Marta, treballar amb tu ha sigut realment enriquidor, tant a nivell professional com personal. Si hagués d'escriure aquí tot el que voldria agrair-te necessitaria unes quantes pàgines... Gràcies per haver-me ajudat sempre quan sorgien problemes al lab y quan els problemes eren personals, serà molt difícil anar a treballar a un altre lloc i que no hi siguis. Només espero que el mail y l'skype ens mantinguin unides per més que ens allunyem físicament-. A través de Marta V conocí a Javi F (sí, jo no tenia ni idea de que estàveu junts, no m'entero de res...contents?!!) que resultó ser también una persona encantadora dispuesto siempre a solucionar problemas y a hacer unas cenas riquísimas!!.

Hacia la mitad de mi estancia en el ICCC llegó Juli al grupo, con sus imitaciones de Torrente y su devoción por la familia Pantoja! Y sobretodo con unas inagotables ganas de trabajar. Lo que nos hemos llegado a reír con él! Hace pocos meses que ha llegado Eli, una gaditana muy graciosa, que ya se está peleando con las células mesenquimales que da gusto!

A parte de los miembros de nuestro grupo, en el ICCC hay muchos otros, pero muchos muchos! De hecho hay tantos que como un 20% no se ni quienes son! Y no porque viva en una cueva sino porque en vez de venir de 1 en 1 vienen de 5 en 5 y como nadie te los presenta... Pero bueno, además de los diferentes ejércitos clónicos de técnicos y post-docs que han llegado últimamente, hay una serie de personas (que si se como se llaman!) con las que he vivido muy buenos momentos. En nuestro piso hemos compartido risas y balanzas con el grupo de fisiología celular, donde sobretodo montan jaleo Cristina y Jordi! Yo personalmente tengo que agradecer a Oriol y M^a Ángeles, integrantes del servicio de histología, toda la ayuda que me han prestado con mis dudas histológicas. También agradecer a Oriol que se jugara la vida con las altas esferas dejándome su mesa y a M^a Ángeles las agradables charlas que hemos compartido y ese afán por ayudar siempre, ha sido un verdadero placer teneros cerca. Una vez pasado el ascensor del piso 2 está el confocal y el cortador de rodajas??!! donde viven en penumbra y temperatura variable Esther y Maribel. Quiero agradecer a la primera sus intentos de proporcionarme siempre una sesión de confocal aunque éste estuviera a punto de explotar y a Maribel su simpatía y sus comentarios estadísticos. El grupo de Pilar Rivera con DIF (trobo que aquest nom et queda molt bé, no?!!) como becario también habita en el piso 2 y comparten con nosotros la masificada sala 106 de cultivos, -vinga David, que quan marxi et deixaré les meves hores de cultius!-. Al final del piso está Pablo cristalero (que seguro no es tu apellido pero te viene fenomenal!) con Rosa -que se pasa el día arriba y abajo del pasillo criando

bacterias- y las becarias Maria y Elena, tan dicharacheras como currantes y es que tienen el record de horas trabajadas en el centro sin ningún tipo de dudas!

Hasta hora he hablado sólo de la gente del piso 2, o sea, los otros, o es que en algún otro piso fallan los sistemas de calefacción y aire acondicionado con tanta insistencia? Seguro que no, yo estoy convencida de que nos quieren liquidar, pero que tengan claro que somos un hueso duro de roer y es que mala hierba...!!!

En la planta baja está María que siempre te saluda con una sonrisa al abrir la puerta y todo un montón de secretarios/as, contables y comunicadores que te hacen preguntarte si aquello es en realidad un centro de investigación! Allí abajo además de dirección y gerencia hay 3 laboratorios donde recuerdo especialmente a Xevi, Montse, Rodrigo (con quien he compartido penas en el estabulario! -ya todo va mejor, no?, me alegro!-), Blanca...

En la primera planta la densidad de becarios por unidad de espacio aumenta considerablemente y es que allí se encuentran el LOX lab con Ana (l'abella més chic de la història), Olivier (dale una hora y te llena el incubador de células!), Javi F (y sus problemas proteínicos, -ja veuràs que acabarà sortint-), Javi C (el citómetro&residuos man, siempre con una broma y una pregunta personal a punto!), Silvia (la técnico más eficiente del mundo), María (la burgalesa loca que se corta dedos con un hacha india de plástico!), Maurizio (un currante de pies a cabeza que nos ha hecho reír infinidad de veces -ciao!-)... y el lab del grupo de Vicenta con Sandra, Laura, Paula (la chica luminómetro!!), Jose... En este piso está también el servicio de cultivos, dirigido con mano férrea por Nia y sus pupilas Patri y Sonia. Que te voy a decir Sonia que no te haya dicho ya! Nos hemos contado media vida entre cambio de medio y limpieza de incubador! Tu simpatía y tu alegría son difíciles de encontrar! Aunque Patri está cogiéndole también el pulso al curro y la queremos a pesar de sus notas inquisidoras!! (sí, yo también lleno la sala 106 de notas, y que?!)

En el piso 4 o biblioteca hay otro montón de gente, me llevo un recuerdo especial del sector ping-pong-escritura tesis integrado por Judith, Sandra, Marta V y María con quienes he compartido 2 m² y 4 conexiones a internet (ICCC en lluita!) y muchas horas, ha sido agradable interactuar con vosotras, sobretodo con las 2 primeras porque casi no lo habíamos hecho en los 3 años anteriores. También quiero agradecer a Laura C el dejarme los cascos, el cargador del movil, el celo, la grapadora y dejarme echarle los rollos de mis historias de la tesis!, a Gemma por tener siempre una sonrisa y una frase agradable que decirte, a Angie por ser tan encantadora y adentrarme en el arte de la cría de ratones - espero que tu próxima etapa científica sea fructífera-, a Pablo por tener un comentario divertido a las tantas cada día, a Marta M por dejarme el atril, a Ana por dejarme el cargador del portátil... Me dejo a mucha gente pero es que con algunos sólo he cruzado unas pocas palabras! De todas maneras la fauna de la biblio es genial!

No he acabado con el ICCC todavía! Como voy a olvidarme de la gente del estabulario??! Quiero agradecer especialmente a Sonia –que se ha ido recientemente- su capacidad infinita para soportarnos, sus servicios de chofer de ratones a la UAB y esas conversaciones tan entretenidas que nos brindaba (eso si, mi mail te agradece que hayas dejado de mandar 10 mails por día!!), también a Pablo y a Ángel que cuidan con cariño a nuestros queridos ratones, muchas gracias! Un beso para Fanny, una mujer que ha vivido un montón de cosas y que ama a los animales con locura y la persona que más y mejor limpia de mundo, podríamos comer en el suelo del estabulario y peinarnos utilizándolo de espejo!

Quiero recordar a los que se fueron antes que yo, a Marta O que era el ángel de cultivos, a Berta que te sorteaba una célula aunque tuviera que amenazar de muerte al láser GFP, a Mónica “tubos” (no te enfades!) que aunque ponía las puntas a su ritmo era muy entretenida, a Jose Luis que nos dedicó unas bonitas líneas en su despedida y a Lluís que acabó la tesis cuando yo empezaba a

escribirla y que está infinitamente más contento desde hace un par de meses (porqué será??!!).

Seguro que me he dejado a mucha gente, no me lo tengáis en cuenta, ya sabéis que soy un poco despistada! Tengo que deciros – y no lo reconoceré en público- que ha sido un placer trabajar con todos vosotros, espero que a todos os vaya genial y que la vida os brinde una alegría tras otra!

Paralelamente a las diferentes fases académicas de mi vida he encontrado a otras personas. Quiero destacar a mis amigos del pueblo, que sería de mi vida sin todos vosotros?? No bebería tan bien ni de lejos! Quiero agradecer a todos ellos su compañía, amistad y apoyo durante todos estos años que hace que nos conocemos, a mi hermano que es el abuelo del grupo y me deja –gracias al señor- las llaves debajo del felpudo, a Miguel que aunque te hace comentarios chungos a veces y es un “brasas” es una gran persona, a Fer que a pesar de que no le gusta ningún juego de mesa nos monta unas fiestas de disfraces de impresión!, a Juan que es un artista atrapado en el cuerpo de un teleco que colabora con peña chungu diseñando cosas para aviones de guerra (que ya se que no!), a kike que es el mcgyver del grupo (te monta una antena con una patata y un tenedor y un grifo que saca espuma que te pasas!) y con quien me he contado casi toda mi vida y sobretodo a las chicas. Agradeceré una vez más al azar o al destino o a lo que sea que me haya cruzado con las SB: Marta (la directora banquera que nunca llama ni contesta los mails –aunque si los lee!- y que ha puesto del revés su vida en unos meses, di que si!), Silvia (la SB menos diplomática, pero sea lo que sea te lo dice con tanto cariño que como te vas a enfadar...es una currante nata y sin lugar a dudas acabará consiguiendo lo que se proponga), María (mi primi, cuantas noches sin llaves hemos dormido juntas, eh?! Es sobrecogedora la forma en la quiere a prácticamente todo el mundo y ese afán infinito por el diálogo que posee), Pati (la peque del grupo, yo me siento especialmente protectora con ella y con una

empatía muy fuerte, deseo y mucho que se cumplan todos tus sueños) y Elena (mi novia odontóloga, te acuerdas cuando quedábamos con Pati clandestinamente para ir a ver la Sirenita?!! Que risas. Elena hace las caras más graciosas del mundo y aunque parece la más dura, luego es un trozo de pan). Y es que hace ya mucho que nos lavábamos el pelo en el río para que nos quedara más brillante o que fumábamos cigarrillos de chocolate pero lo que es increíble es que los encuentros sigan sucediéndose y las anécdotas acumulándose. Han sido muchas y muy variadas las cosas que hemos vivido juntas y espero que siga así para siempre. Ni mi vida ni este mundo sería el mismo sin vosotras, mua!

En el pueblo también he disfrutado de la compañía de mis abuelos (un beso para Lela que donde esté seguro que sólo come chorizo y naranjas ácidas y que se está riendo diciendo “hay que demontre”), de mis tíos Marcial y Mercedes ya fallecidos (que se llamaban en realidad Vidal e Irene) a los que apreciaba muchísimo y de otros tíos más jóvenes, Pepi y Miguel, que siempre me ofrecen comida y me preguntan por la tesis cuando voy a buscar a María.

De mi familia sólo he hablado un poco al principio, así que ahora comentaré un par de cosas más! Quiero decir aquí que mi madre es y será siempre uno de los ejemplos de mi vida, una persona que salió del pueblo con 18 años sin nada más que un montón de energía e ilusión y llegó a ser lo que se propuso, una super ejecutiva. Por esto siempre pienso que cada persona puede hacer todo lo que se proponga en la vida. Mi padre, es una persona excepcionalmente buena, a pesar de que tiene un poco de mal humor y siempre “refunfuña”! Creo que ha sufrido más de lo que merece y quizás sacar las cosas fuera le hiciera bien, dicen que “nunca es tarde si la dicha es buena”. Con mi hermano, aunque nos hemos llevado un poco mal a veces, ahora tenemos una muy buena relación y yo me alegro de eso y de que actualmente vea la vida con un optimismo antaño inexistente junto a Noe, mi cuñada hiperactiva. Mi abuelo es adorable, aunque no recuerde que mi

prometido se llama Álex o que mi madre no es mi abuela, nunca olvidaremos las historias de Frutos “no me lo acordó mi padre!!”. Gracias a todos por haber estado siempre ahí para dar un abrazo, una sonrisa o una fiambra! Por muy lejos que me marche siempre os llevaré en el corazón.

No me puedo olvidar de mi familia política a los que aprecio como si siempre hubieran estado ahí! Y no sólo porque me lleven al aeropuerto, me inviten a comer y me hagan hacer de canguro, sino porque todos ellos: Juan, Luisa, Silvia, Oscar, Noelia y Héctor son encantadores (soy consciente que aún nos queda mucho por cangrear en el extranjero!). Quiero agradecer aquí a Álex (el guiri de Biofísica) todo su apoyo y su amor incondicional, sin tí esto no hubiera sido posible y además de verdad porque la tapa de esta tesis es creación tuya! T'estimo ninu i estic molt contenta de poder compartir a partir d'ara tantes i tantes aventures que ens pasaran, ja siguin viatges, ciutats, feines o bessones arrissades!

En estos dos últimos años me he aficionando al baloncesto hasta niveles insospechados y sobretodo a la “Penya”, por culpa de Álex que quede claro. Al hacerme socia conocí a gente muy divertida, un abrazo para todos ellos, en especial para Arnau y Laia, dos personas que me han tratado como si me conocieran de siempre. I ara a conquerir la ULEB a Turín!

Quiero agradecer también a la estadística el haberme dado nuevas metas, nuevos retos y el haberme quitado horas de sueño! Probablemente estaría más sana y menos delgada si no hubiera decidido estudiar otra carrera, pero seguro que no estaría tan contenta!

Y por último y como dicen en inglés, last but not least, quiero agradecerme a mí misma el tesón y la voluntad mostrados hasta la fecha. Porque todos vosotros

habéis sido más o menos importantes, pero si no hubiera sido por mí esta tesis no sale ni de broma! Tengo por tanto que darle la razón a la niña post-it que decía que yo podía hacer todo lo que me propusiera y que definitivamente soy una campeona, soy una campeona y soy una campeona!

Publicaciones



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Biomaterials 28 (2007) 2718–2728

Biomaterials

www.elsevier.com/locate/biomaterials

Analysis of progenitor cell–scaffold combinations by *in vivo* non-invasive photonic imaging

Irene Román^a, Marta Vilalta^a, Julio Rodriguez^a, Annette M. Matthies^b, Samer Srouji^c, Erella Livne^d, Jeffrey A. Hubbell^b, Nuria Rubio^a, Jerónimo Blanco^{a,*}

^aCardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Hospital de Sant Pau, Barcelona 08025, Spain

^bInstitute of Bioengineering and Institute of Chemical Sciences and Engineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

^cMaxillofacial Surgery Department, Carmel Medical Center, Haifa, Israel

^dFaculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

Received 2 November 2006; accepted 2 February 2007

Available online 20 February 2007

Abstract

Recent developments in stem cell research have promoted a flourishing of new biomaterials and scaffolds for tissue repair. However, there is a scarcity of procedures to monitor the performance of scaffold–stem cell combinations implanted in live animals, avoiding the inherent artefacts associated with *in vitro* assay conditions. We report the implementation of a procedure based on the use of the luciferase gene as a cell proliferation tracer to monitor, by *in vivo* non-invasive imaging, the performance of stem cell–biomaterial combinations used for tissue regeneration. In a model system using immunodepressed mice we show preference of a mouse embryonic mesenchymal cell line (C3H/10T1/2) for specific implantation sites and biomaterials during a prolonged *in vivo* growth period (3 months). Moreover, we analyzed the safety of implanted cells using a sensitive luminometric procedure and showed that the implanted cells did not spread to other organs. Our results demonstrate the utility of this simple and resource-saving procedure in the development and screening of biomaterials for tissue engineering.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *In vivo* imaging; Cell proliferation; Scaffold; Luciferase; Enhanced green fluorescent protein (EGFP)

1. Introduction

The shortage of donor tissue and organs for transplants has promoted a large research and development effort aimed at generating alternative therapeutic solutions, for the millions of patients that suffer each year from organ failure [1].

There are multiple cell types with potential for tissue regeneration [2]. Autologous adult stem cells derived from specific organs, e.g. the bone marrow and fat, are capable of differentiating to adipose tissue, bone and cartilage and appear as ideal candidates for cell therapies [3–11], avoiding problems associated with immune rejection, pathogen transmission and ethical issues. Scaffolds [12] are three-dimensional delivery vehicles, providing physical,

chemical and biological information that directs stem cell proliferation and differentiation towards the desired cell types and structural organizations [13]. Additionally, scaffolds should be non-toxic, non-inflammatory, non-immunogenic and should disappear once their function ceases to be required.

In practice, scaffold design is an empirical process of trial and error directed at achieving a defined objective, that is, a well-structured and functional tissue. The scaffold designer must be able to analyze the capacity of materials already existing or designed with specific functionalities in mind to sustain cell implantation, proliferation and to direct appropriate cell differentiation [14,15]. Thus, the capacity to monitor *in vivo* the functional state, e.g. proliferation and differentiation, of cells seeded in scaffolds is of great importance for scaffold design.

Photinus pyralis luciferase (Pluc) catalyzes the oxidation of luciferin in the presence of ATP and coenzyme A,

*Corresponding author. Tel.: +34935565905; fax: +34935565559.

E-mail address: jblancof@csic-iccc.santpau.es (J. Blanco).

producing light and O₂. Due to an almost complete absence of endogenous photons in mammalian cells, except for very low-intensity luminescence resulting from some redox reactions [16], the existence of highly sensitive light measuring instruments allowing detection of the enzyme at a concentration of 1×10^{-19} mol/l and the lack of requirement for post-translational modification, Pluc is a very convenient and quantifiable cell reporter [17].

Despite the apparent opacity of tissues, light can be used to probe physiologic functions and structures at depths of several millimeters [18,19]. These optical properties of tissues allow the generation of images of cells implanted in live organisms. Light from genetically manipulated cells expressing Pluc has been used in the past to non-invasively monitor gene activity in tissues of small animals, such as mammalian embryos [20,21]. In larger animals such as mice, Pluc fused to the human immunodeficiency virus promoter has been used to report on the activity of the promoter transgene [22], to study the clearance rate of a Pluc-expressing HeLa ascites tumor during antineoplastic drug treatment [23], for non-invasive *in vivo* quantification of Pluc-labeled tumor metastases [24], and for monitoring expression of osteocalcin during bone formation [25].

In the present work we report the implementation of a well-defined assay platform, based on non-invasive imaging, to monitor the proliferation behavior of Pluc expressing cells seeded in biomaterial scaffolds implanted in live animals, which should be of general application in scaffold design and regenerative medicine.

2. Materials and methods

2.1. Retrovirus

Retroviral vector prEGFP-CMV-Pluc, used for cell labeling contains the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene sequence under control of the 5'LTR and the Pluc gene coding region under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. The Pluc gene was excised from the pSP-luc+ vector (Promega Corporation, Madison, WI) and cloned into the pRC/CMV vector (Invitrogen, San Diego, CA). To generate the vector prEGFP-CMV-Pluc, the CMV promoter and the Pluc gene were inserted in the pSFB91EGF vector (provided by Dr. C. Baum) [26].

2.2. Cell culture and viral transduction

Human embryonic kidney cells 293GPG (provided by Dr. D. Ory) [27] were used for packaging of viral particles. The cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Media-high glucose (DMEM-hg) (Sigma, Steinheim, Germany), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 units/ml penicillin/streptomycin (Sigma), 1 µg/ml tetracycline (Sigma), 2 µg/ml puromycin (Sigma) and 0.3 mg/ml G418 (Sigma). Cell cultures were trypsinized and plated the evening prior to transfection. The following day, tetracycline was removed and the cells, now 90–95% confluent, were transfected with the prEGFP-CMV-Pluc construct using lipofectamine and plus reagent (Invitrogen). The culture supernatants were collected every 24 h until 120 h and used to transduce the C3H/10T1/2 mouse embryonic cell line (ATCC, Rockville, Maryland).

C3H/10T1/2 cells were grown in DMEM D7777 (Sigma) supplemented with 1.5 g/L sodium bicarbonate (Sigma), 1% penicillin/streptomycin and 10% FBS and were plated at a density of 10^4 cells/well in 12 well plates the

day prior to transduction. For transduction, 1 ml of the 48–96 h supernatants supplemented with 100 µl of protamine sulfate (Sigma) 50 µg/ml was added to the cells and incubated for 8 h, after which the media was replaced with fresh media and the cells were allowed to continue growing. This process is repeated during a 3-day period. The higher 6% EGFP expressing cells (C3H/10T1/2.Pluc) were selected by FACS, expanded and used for seeding in the scaffolds.

2.3. Luciferase assays

Luciferase activity results in the generation of light in the green region of the spectrum, wavelengths 500–650 nm.

Light production capacity of C3H/10T1/2.Pluc cells was measured using a standard curve generated with 10, 50, 250, 500 and 1000 lysed C3H/10T1/2.Pluc cells in reporter lysis buffer (RLB) (Promega). To determine luciferase activity, 100 µl of luciferin (Promega) were added to the cell lysates (20 µl) and following a 2 s delay measured in a luminometer (Berthold detection systems, Pforzheim, Germany) using a 10 s integration period. Light measurements were expressed as relative light units (RLUs).

2.4. Seeding of scaffolds

Three materials were tested in the present study: a polyethyleneglycol (PEG) hydrogel cross-linked to a RGD peptide (hydrogel-1) [28], a gelatine-glutaraldehyde hydrogel (hydrogel-2) [29] and calcium alginate beads. To prepare hydrogel-1, 20 µl of PBS were added to a pre-made 7% PEG-RGD frozen aliquot (mix 1). In a different tube, 49.6 µl of triethanolamine (Fluka, St. Gallen, Switzerland) 0.3 M pH 8 were added to a pre-made aliquot of lyophilized matrix metalloproteinase (MMP) cross-linker and then mixed with 20 µl of medium containing 4×10^5 C3H/10T1/2.Pluc cells (enough for 4 implantations). Then 132 µl of the re-suspended PEG-RGD (mix 1) were added to the MMP cross linker mix. For hydrogel-2, 200 µl of medium containing 7×10^5 cells (enough for 4 implantations) were poured drop wise over the upper surface of the pre-made and lyophilized scaffold material, and placed for 45 min in a 37 °C CO₂ incubator, after which 1 ml of medium was added and cultivation continued. To prepare alginate beads 3.5×10^6 cells were suspended in 400 µl of a 1.2% low-viscosity alginate (Sigma) solution in NaCl 0.15 M. The suspension was added drop wise through a 23-gauge needle to a 100 mM CaCl₂ solution, where the drops were allowed to gel for 10 min. The formed beads were then washed four times in NaCl 0.15 M and once in C3H/10T1/2 medium. Each bead contained approximately 8.5×10^4 cells. Two beads were implanted in each site. Cell seeding was done 5 days in advance of the implantation for hydrogel-2 and alginate, or the same day of implantation for hydrogel-1. C3H/10T1/2.Pluc cells without scaffold (control) were trypsinized, suspended in media without FBS and 50 µl containing 1.5×10^5 cells were inoculated per site.

2.5. Inoculation of scaffolds in nude mice

Six-week-old BALB/c homozygous nude (nu/nu) mice were purchased from Charles-River (Wilmington, MA) and maintained in a specific pathogen-free environment throughout the experiment. All animal-related procedures were performed with the approval of the animal care committee of the Cardiovascular Research Center and the Government of Catalonia. Four implantations were performed symmetrically in each animal: two subcutaneous (SC) on the back and one intramuscular (IM) in each thigh. Each material was tested in 6 mice, each mouse receiving one material in its left side and a different one in its right side. Cells without scaffold were also injected SC and IM. Before scaffold implantation, the animals were anesthetized by an intraperitoneal injection with 100 mg/kg ketamine (Merial, Duluth, GA) and 3.3 mg/kg xilacine (Henry Schein, Melville, NY) and immobilized. To implant hydrogel-1 the material components were mixed with the cells, as described, and immediately 25 µl were injected in each site. The mixture gels inside the animal within 10 min. To implant hydrogel-2 and alginate scaffolds, a puncture was made

through the mouse skin (SC) or skin plus thigh muscle (IM) using a 16 G needle and then, 30 μ l of the gelled material was implanted using a syringe fitted with a bevel ended pipette tip. Finally, the perforations were sealed with 3 M VetbondTM (3 M Animal Care Products, St Paul, MN) surgical glue. To implant no-scaffold controls, cells suspended in medium without serum were directly injected in each site.

2.6. *In vivo non-invasive imaging and image analysis*

In vivo optical imaging of engrafted nude mice was performed as described previously [30]. Mice were anesthetized and 50 μ l of luciferin (16.7 mg/ml in PBS) were injected *in situ* and images were acquired during a 5 min period, starting 5 min post luciferin inoculation. For imaging, the animals were placed at 247 mm from the camera objective (HFP-Schneider Xenon 0.95/25 mm) using the maximal diaphragm aperture, in the detection chamber of a high-efficiency ORCA-2BT Imaging System (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) provided with a C4742-98-LWG-MOD camera fitted with a 512 \times 512 pixel, charge couple device (CCD) storing 230,000e⁻/pixel, cooled at -80 °C. The CCD responds to light of 300–900 nm with a quantum yield of 90% for wavelengths between 500 and 700 nm. Immediately after image acquisition, while the animal remained in the same position, a second image of the animal was obtained using a white light source inside the detection chamber. To increase detection sensitivity the reading noise of the recorded signal was reduced by adding together the light events registered by arrays of 8 \times 8 adjacent pixels (binning 8 \times 8) of the camera CCD. Mice were imaged at days 0, 7, 14, 30, 45 and 90 post-implantation.

Quantification and analysis of photons recorded in images was done using the Wasabi image analysis software (Hamamatsu Photonics). In order to establish the correlation between the number of transplanted cells and the emitted light, a standard curve was generated by grafting 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 C3H/10T1/2.Pluc cells suspended in DMEM-hg in the thigh of nude mice. The animals were imaged the same day of the injection as previously described.

Light measurements were expressed as photon counts (PHCs). Data is represented as the number of PHCs versus number of grafted cells. The slope of the linear regression curve is the number of *in vivo* PHCs per transplanted cell. Color images were generated using an arbitrary color palette representing standard light intensity levels (blue = lowest; red-highest). To calculate the number of PHCs from a selected area of interest, the number of recorded PHCs is extracted from the image memory and the average number of PHCs/pixel is calculated using the Wasabi image analysis software (average PHCs/pixel). The same operation is performed for an area of the mouse image memory containing no implanted cells (average background PHCs/pixel). Net number of PHCs in the area of interest = [(average PHCs/pixel) – (average background PHCs/pixel)] \times (number of pixels in the area of interest).

2.6.1. *Display of acquired images*

There are important differences between the way data is stored in the image memory for each pixel of the recording device, the CCD, and the way in which such data is represented by the computer graphics in the monitor. While the image memory can store 65535 different light levels corresponding to the number of light events reaching the CCD's pixels, the computer graphics can only display 256 different gray or pseudo color levels for each pixel. Thus, the printed images corresponding to memory images that contain more light levels than the available computer display levels will either be unable to represent low intensity levels, or conversely, will represent well the low intensity levels but will be saturated for the higher intensity levels. In the current work, we have decided to bias the representation towards low intensity levels, which results in saturated high intensities, red color in the scale.

2.7. *Cell migration*

To determine migration of cells implanted within scaffolds to other organs, after the 3-month period of *in vivo* growth, two animals from each

test set (the ones producing most light at the implantation site) were chosen. Target organs (brain, liver, spleen, lungs, hip bone and lymph nodes) were harvested, homogenized and assayed to determine Pluc activity using a very sensitive luminometric procedure as described [31], capable of revealing the presence of 50–100 cells per organ.

2.8. *Histology*

At the end of the *in vivo* phase of the experiments, for each of the test groups, one of the IM implantation zones was selected, harvested, washed with PBS and after de-boning included in OCT. Sections of 5 μ m were prepared using a cryostat (Leica, Wetzlar, Germany) and stained with hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) and eosin (Sigma).

2.9. *Recovery of cells from implanted scaffolds*

At the end of the 90-day *in vivo* growth period, a thigh muscle from one mouse of each test group was harvested, washed with PBS and minced. The tissue fragments were placed on a tissue culture plate and covered with a thin layer of C3H/10T1/2 medium plus 2% penicillin/streptomycin and 1 μ g/ml fungizone (Sigma). The following day fresh medium was added and cultivation was continued until EGFP positive cells were observed migrating out of the tissue fragments. Cells freed from the tissues were trypsinized, seeded in fresh medium and cultivated until there were enough cells for fluorescence intensity and Pluc activity determinations.

2.10. *Statistical analysis*

The average of net PHCs normalized to those of day 0 was used to compare the behavior of the labeled cells seeded on the different scaffolds. The data were analyzed using SPSS version 14 software using the General Lineal Models (GLM) method. To evaluate the effect of the scaffold type on the cell proliferation a two-way ANOVA was performed (significance was assumed when $p < 0.05$).

3. Results

3.1. *Light production by C3H/10T1/2.Pluc cells in vitro*

To determine the amount of light generated by the C3H/10T1/2.Pluc cells in culture, Pluc activity was measured in lysates generated from predetermined numbers of cells. Fig. 1 shows a standard plot of light production, expressed as RLUs, versus the number of cells in the lysates. The slope of the linear regression plot, the number of RLUs generated by a single cell, was 213 RLUs/cell.

3.2. *Non-invasive detection of intramuscularly implanted C3H/10T1/2.Pluc cells*

Predetermined numbers of C3H/10T1/2.Pluc cells were inoculated in the thighs of nude mice and imaged as described. The number of detected PHCs, extracted from the recorded images (Fig. 2a), was plotted versus the number of inoculated cells (Fig. 2b), following subtraction of the background noise, from an image area devoid of implanted cells. The data shows that a minimum number of 5000 cells were required for detection. Moreover, the linear relationship between cell number and PHCs indicates that the intervening tissue has a linear quenching effect on transmitted light photons. The slope of

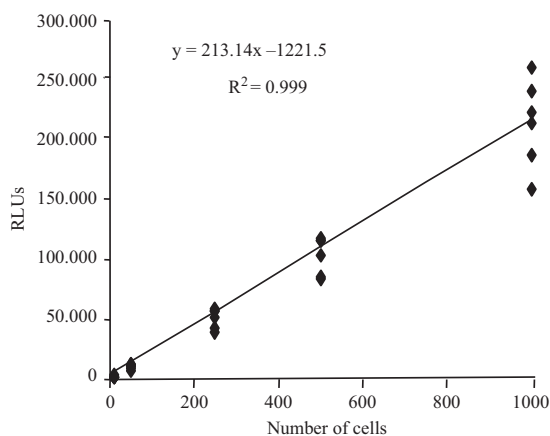


Fig. 1. *In vitro* luminescence from C3H/10T1/2.Pluc cells. The graph shows the light production capacity of 10, 50, 250, 500 and 1000 cells. Light production is expressed as relative light units (RLUs). The slope of the regression line is the number of RLUs/cell. R = correlation coefficient.

the standard plot shows that the number of non-invasively detected PHCs/cell was 23.4.

3.3. Cell proliferation *in vitro*

A fraction of the seeded scaffold was kept in culture and the rest was implanted in nude mice. The morphology of cells seeded in the scaffolds kept in culture was monitored by light and fluorescence confocal microscopy, using the EGFP fluorescence (fluorescence microscopy excitation range for EGFP was from 515 to 560 nm and emission was at 590 nm) (Fig. 3). Cell morphology depended on the type of scaffold, thus, while cells seeded in hydrogel-1 and alginate beads retained a round morphology, cells in hydrogel-2 adopted fibroblastic morphology a few hours post seeding.

Each scaffold material had a characteristic behavior *in vitro*. Hydrogel-1 and alginate beads retained their integrity throughout a 4-month period while hydrogel-2 disintegrated within 6–8 weeks.

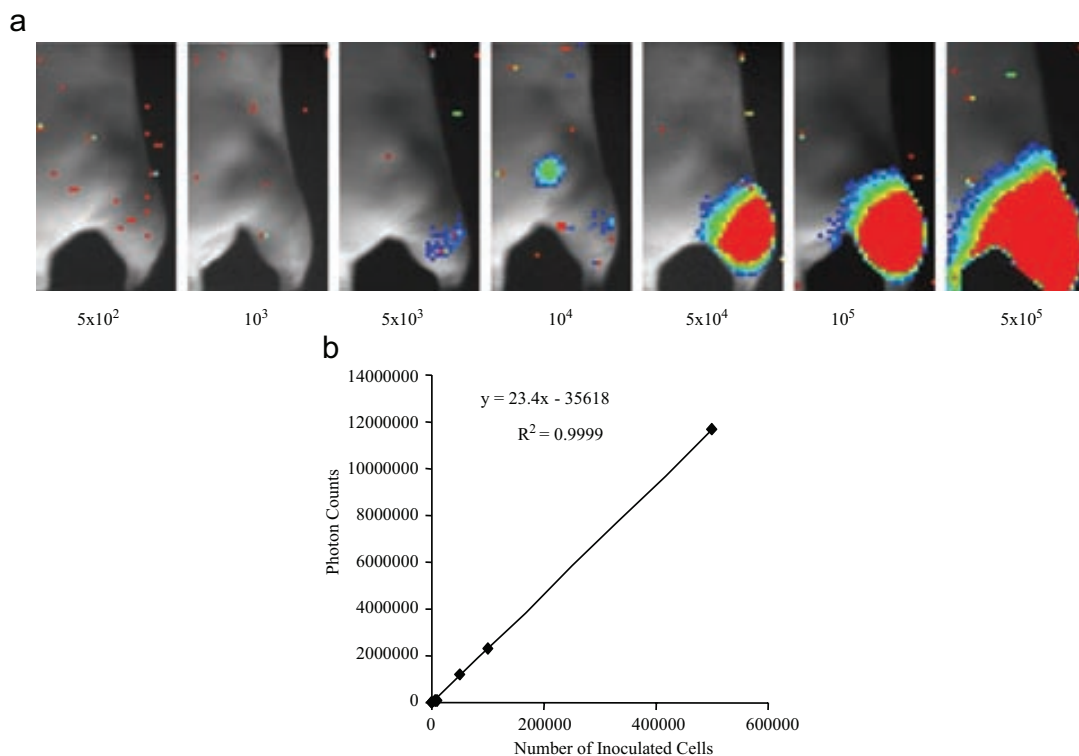


Fig. 2. *In vivo* detection of C3H/10T1/2.Pluc cells. (a) 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 C3H/10T1/2.Pluc cells were inoculated in the tights of nude mice and directly imaged after addition of luciferin. (b) Photon counts (PHCs) recorded in the images were plotted, after subtraction of background PHCs, versus the number of cells inoculated. The slope of the regression line is the number of PHCs/cell. R = correlation coefficient.

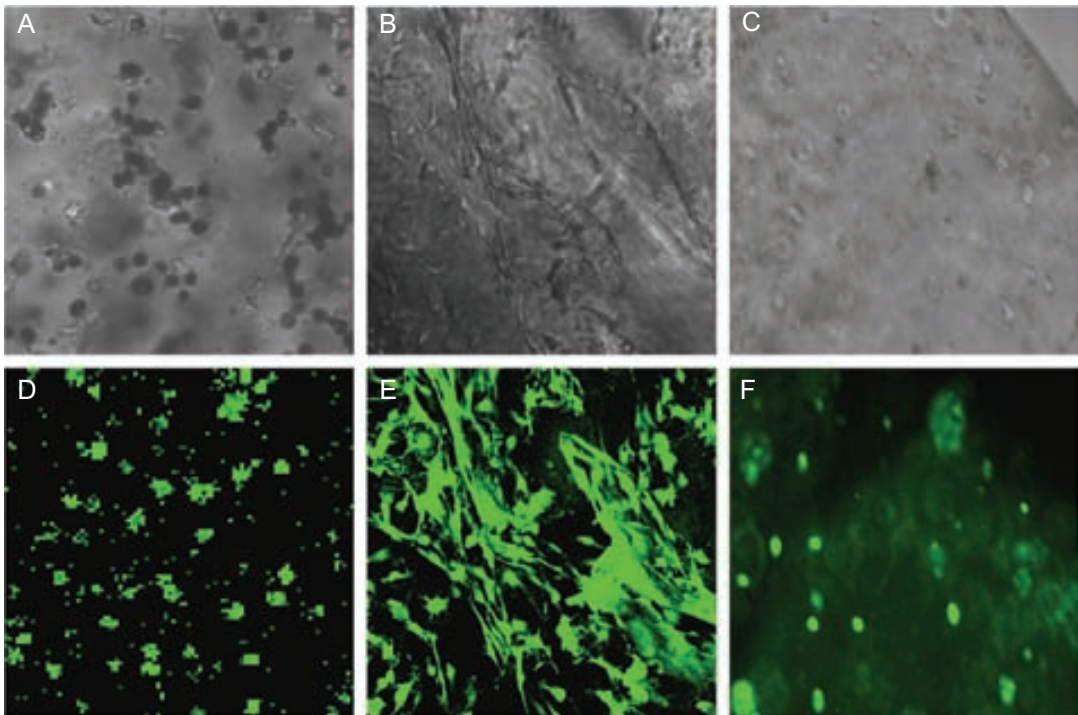


Fig. 3. Light microscope images of hydrogels-1, -2 and alginate beads seeded with C3H/10T1/2.Pluc cells. Images of hydrogel-1 (A, D) and hydrogel-2 (B, E) were obtained using a confocal microscope (objective: $63\times/1.3$, eyepiece: $10\times/20$,) and images of alginate beads (C, F) were obtained using a standard phase contrast microscope (objective: $20\times/0.4$, eyepiece: $10\times/20$). (A–C) White light images, (D–F) fluorescence light images.

3.4. Proliferation of C3H/10T1/2.Pluc cells *in vivo*

The capacity of the different scaffold materials to sustain proliferation of C3H/10T1/2.Pluc cells *in vivo*, in two different physiological environments (SC and IM), was analyzed by non-invasive photonic imaging of seeded scaffolds implanted in nude mice. Fig. 4 shows pseudo-color series of representative “halve mouse” images, each representing a different scaffold material, throughout the experiment period. The remaining images are included as supplementary data. Quantitative data on cell proliferation was obtained by counting image-recorded PHCs from the scaffold regions and subtracting background PHCs from a representative equivalent area devoid of scaffold (Figs. 5a and b). To account for inevitable differences in the seeding efficiency of scaffolds, data is represented as total PHCs and as PHCs normalized to those of day 0 (Figs. 5c and d).

The images (Fig. 4) and the corresponding quantitative data (Fig. 5) extracted from them show that luciferase expressing cells in the scaffolds are easily detectable and remain detectable even 3 months post inoculation.

There was a clear preference for proliferation of cells in the IM sites relative to the SC sites when compared in the same animal and independently of the scaffold material.

Seeded scaffolds and cells without scaffold implanted SC were generally unable to proliferate and mostly disappeared, only 3 mice of 24 showed some cells at SC implants by the end of the experiment. Conversely, cells in IM sites were mostly successful and showed a clear tendency to survive and by the end of the experiment 20 of the 23 IM implantation sites were still populated by cells. Cells implanted without scaffolds went through a pronounced growth crisis, also observed in some of the scaffold implants that took place in the first week post-implantation and was followed by a recovery phase by the second week.

Individual materials implanted at IM sites had characteristic proliferation behaviors. Thus, comparison of the amount of light produced by the implanted cells at days 0–90 showed that cells in the “no-scaffold” control, after an initial growth crisis, tended to barely maintain their number through the experiment, and those in hydrogel-2 and alginate remained stable showing little or no net growth. However, cells in hydrogel-1 clearly proliferated. The difference in performance of the cell–scaffold combinations during the experiment was found statistically significant ($p < 0.05$). Hydrogel-1 was also the best performer at SC sites.

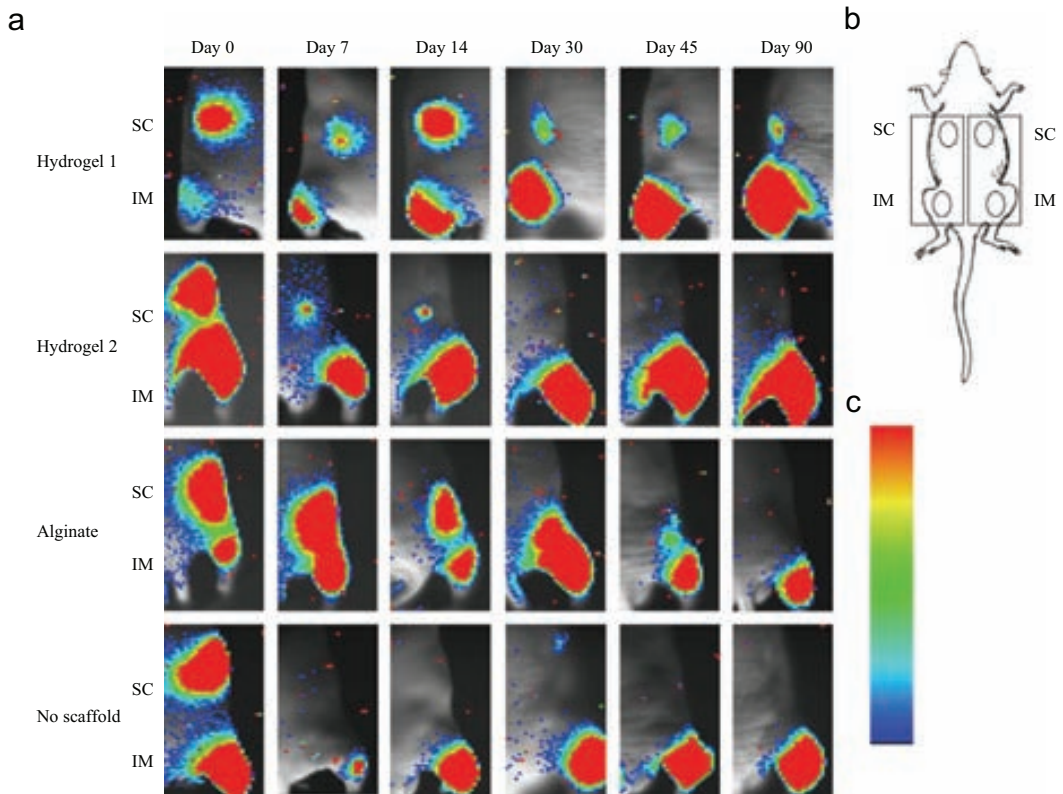


Fig. 4. Proliferation of C3H/10T1/2.Pluc cells seeded in scaffolds implanted in nude mice. (a) Composite images of photons from C3H/10T1/2.Pluc cells (color) at subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) sites, at days 0, 7, 14, 30, 45 and 90 post-implantation, overlaid on the corresponding white light images of mice. (b) Diagram showing the location of SC and IM implants. (c) Standard rainbow color scale used to depict relative light intensities (red = highest; blue = lowest).

3.5. Cell migration

Cells implanted within the scaffolds could have migrated from it and colonized other organs. However, luminometric analysis of Pluc activity in tissue homogenates of brain, liver, spleen, lungs, hipbone and lymph node failed to show the presence of any significant number of luminescent cells from the scaffolds, within the detection limit of the instrument (10 cells/lymph node or 50–200 cells for the rest of the tested organs).

3.6. Examination of the implanted scaffolds

At the end of the experiment, the animals were sacrificed and the scaffold implantation sites were analyzed to determine the fate of the scaffold material. There was no detectable evidence of inflammation in the tissue surrounding the implantation sites, although in histological sections big lymphoid follicles could be detected surrounding the implant sites (Fig. 6) but not in the control animals (muscle without implant) showing that these follicles are developing

an active immune response. The hydrogel-2 and alginate scaffolds were macroscopically degraded during the 90 days of the experiment and had disappeared. However hydrogel-1 material, the most successful, was only partially degraded in the same time period, showed clear vascularization (Fig. 7) and had attached to the skin and muscle tissue layers.

3.7. Recovery of cells from scaffolds and stability of luciferase expression

At the end of the 3-month *in vivo* test period, the scaffold implantation sites from one mouse of each test batch was excised from the thigh muscle, minced and cultivated in C3H/10T1/2 medium during 20 days to allow EGFP cells to escape from the explants. The recovered C3H/10T1/2.Pluc cells were detected by fluorescence microscopy (Figs. 8B and D) and also with the Orca 2BT Imaging System (Fig. 8E), showing that the cells were still expressing luciferase. These cells were then expanded during 20 days, sorted by FACS and the EGFP positive

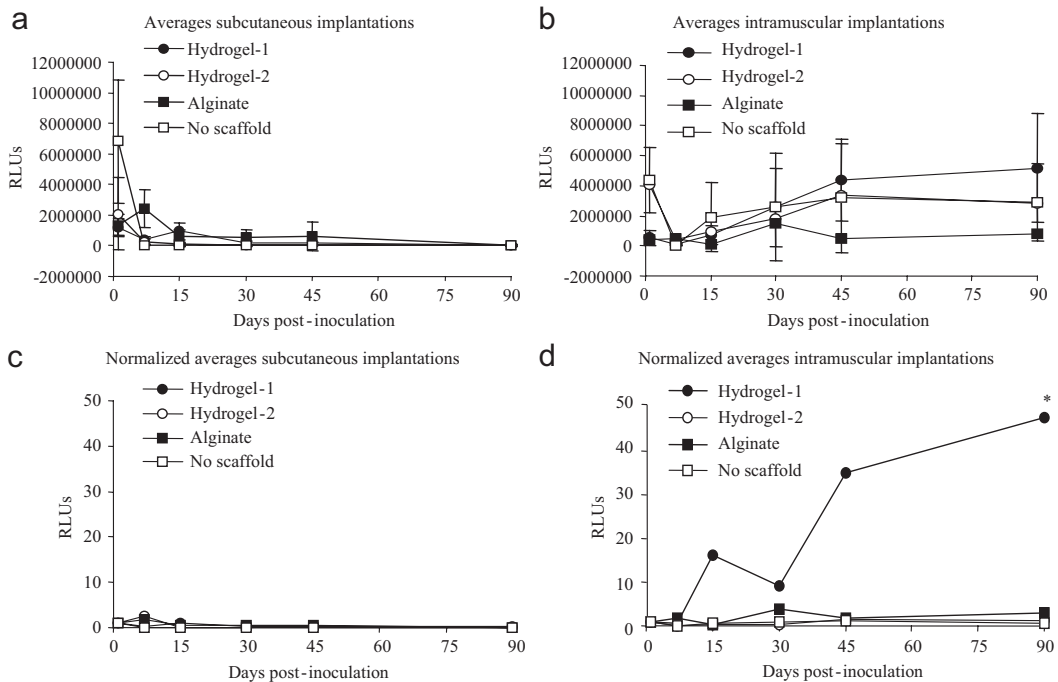


Fig. 5. Quantitative analysis of photon data recorded in scaffold images. After subtraction of background photon counts (PHCs) from all the subcutaneous (a) and intramuscular (b) implant images were plotted versus the elapsed time post-implantation. To compensate for differences in the seeding of scaffolds, PHCs were normalized relative to those at day 0 (c, d). Dots represent the average value at each time point. Bars represent standard deviation.

fraction was analyzed luminometrically to determine their light production capacity (RLU/cell). As can be observed in Fig. 9 the cells recovered from the explants were distributed into two distinct populations (Fig. 9B), both of which fluoresce with lower intensity than the same cells at the time of implantation (Fig. 9A). Moreover, luminometric analysis showed that during the period encompassing *in vivo* growth plus rescue of cells from explants, the light production capacity of the cells had also diminished.

4. Discussion

In the present work we show the use of non-invasive imaging to monitor the performance of scaffolds seeded with model progenitor cells, engineered to express the Pluc gene, implanted in live animals.

In vitro, mouse embryonic C3H/10T1/2.Pluc cells tagged by infection with retroviral constructs for the expression of Pluc and EGFP produced large quantities of photons, 213 RLU/cell, in linear proportion with the number of cells assayed. The analysis of images from live mice inoculated in the thigh, with a known number of C3H/10T1/2.Pluc cells showed that, as few as 5000 cells could be detected (23.4 PHCs/cell) with the Orca system. Implanted

C3H/10T1/2.Pluc cells produced large quantities of light during the 12-week period of growth *in vivo*. Attempts to quantify the amount of light produced per cell, at the end of the experiment, required an additional 40 days growth period in culture to rescue the C3H/10T1/2.Pluc cells from implantation sites and generate enough quantities for sorting and light measurement. FACS analysis of cells rescued from the scaffolds indicated a decrease in the fluorescence relative to that of the cells originally used for seeding the scaffolds, which was also accompanied by a decrease in cell luminescence. We presume that the observed changes in reporter protein expression took place *in vitro* and are likely due to known gene silencing mechanisms such as promoter methylation and/or histone acetylation frequently affecting retroviral vectors [32]. In support of these, further tests to determine stability of light production *in vivo* showed that C3H/10T1/2.Pluc cells implanted without scaffold in syngenic C3H mice produced increasing amounts of light with time during a 16-week test period (data not shown). Thus, it would appear that implantation of the cells *in vivo* has a stabilizing effect against the decrease in gene expression.

We tested the capacity of the scaffold materials to support cell growth *in vivo* by implanting hydrogels-1,

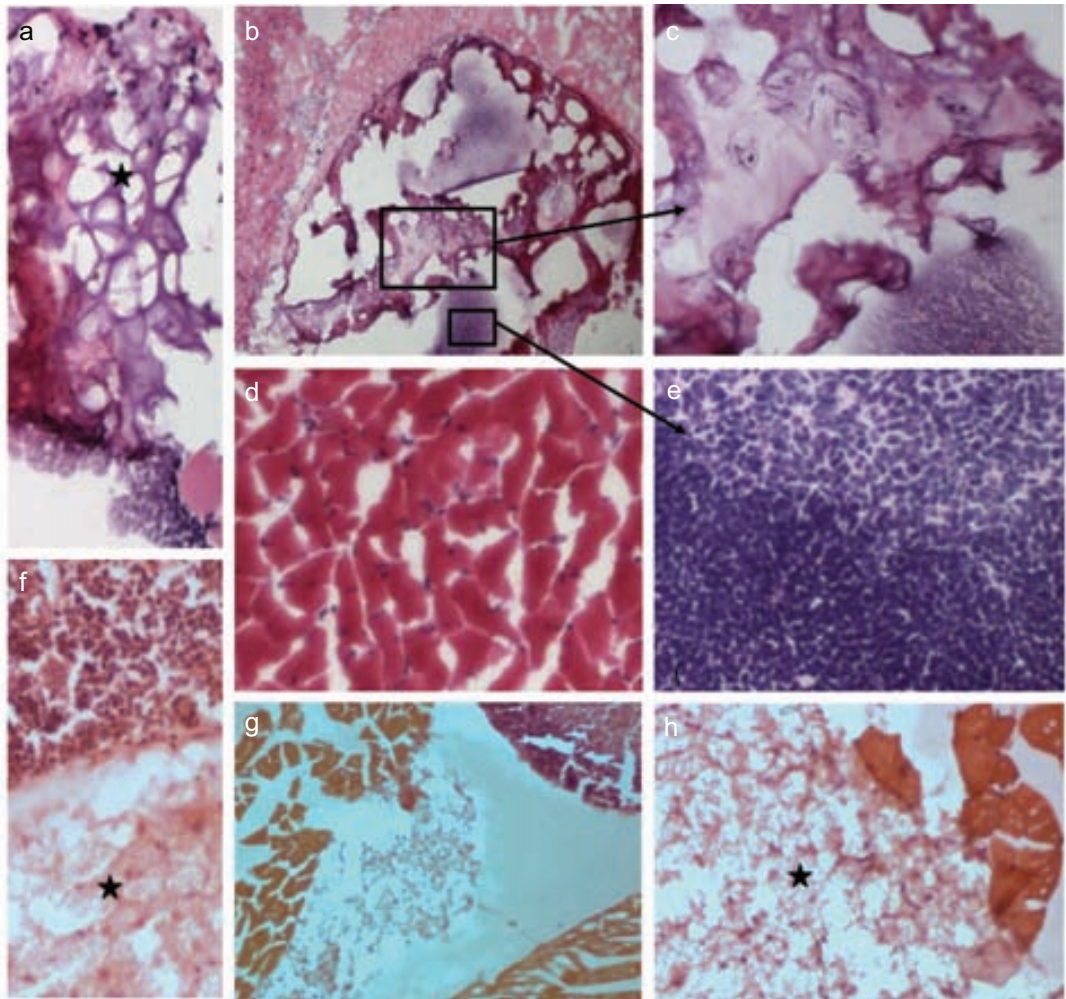


Fig. 6. Histological sections of tissue from intramuscular implantation sites stained with H-E. hydrogel-1 remnants (star) and a part of a lymphoid follicle (bottom), $20\times$ (a). Alginate scaffold remnants (large box), section of a lymphoid follicle (small box) and normal muscle tissue, $10\times$ (b). Alginate scaffold remnants, $20\times$ (c). Expanded muscle tissue section from (b), $20\times$ (d). Expanded lymphoid follicle from (b) $10\times$ (e). Hydrogel-1 remnants (star) and section of lymphoid follicle, $20\times$ (f). Hydrogel-1 remnants (centre), lymphoid follicle and normal muscle tissue, $10\times$ (g). Hydrogel-1 remnants (star) and normal muscle tissue, $20\times$ (h). Objectives: $10\times/0.3$ and $20\times/0.5$, eyepiece: $10\times/25$.

-2 and alginate scaffolds seeded with the C3H/10T1/2.Pluc cells, as well as the cells without scaffold (control) in two different physiological environments, SC (skin of the back) and IM (thigh muscle) of nude mice.

Our results show that the C3H/10T1/2.Pluc cells were unable to survive in any of the scaffolds or without scaffold (control) at the SC implantation sites, where, after the 12-week experiment, only 3 of 23 mice retained some cells at the implantation site.

C3H/10T1/2.Pluc cells implanted IM survived considerably better than when implanted SC, in a scaffold or without (control). At IM sites, 20 of the 23 implanted mice retained cells after 12 weeks. However, each of the samples

behaved differently. Cells without scaffold and some implanted scaffolds suffered a pronounced growth crisis within the first week post implantation from which they progressively recovered, finally reaching a number similar to that originally implanted. Cell numbers in hydrogel-2 and alginate implants showed a tendency to remain stable throughout the experiment. Hydrogel-1 was the scaffold material that showed best capacity to support cell growth, and by the end of the experiment, 12 weeks, cells in hydrogel-1 had increased in number relative to the original implant.

The capacity to support cell growth of hydrogel-1 correlated with the induction of associations with surrounding tissues,

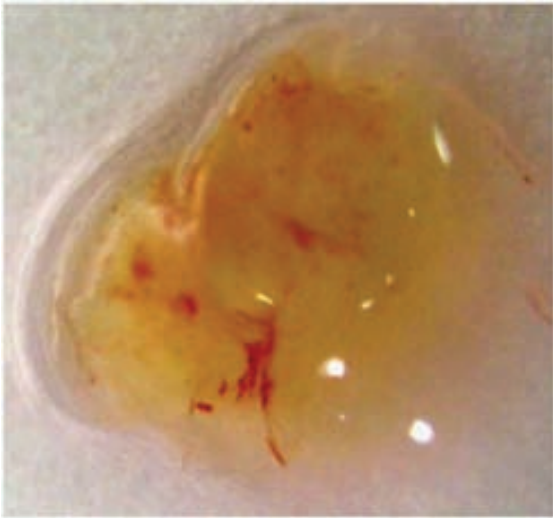


Fig. 7. Appearance of a representative hydrogel-1 scaffold seeded with C3H/10T1/2.Cluc cells recovered from a subcutaneous implantation site after 90 days *in vivo*. The material found adhered to the surrounding tissue was penetrated by capillary vessels.

the presence of a vascular network, the attachment to the muscle tissue layer and the persistence of the scaffold material (which was only partially degraded) by the end of the experiment, neither of which was detected at the implantation site of the other materials. Although no visual signs of inflammation were detected in association with any of the scaffolds, lymphocyte infiltration was observed in histological sections of all of the scaffolds from IM implantation sites.

An important issue related to the use of stem cells for tissue regeneration is the fate of the implanted cells. Frequently, cell based therapies will require the use of quantities of stem cells considerably larger than those directly obtainable from the donors, the necessary cell expansion *in vitro* resulting in an increased risk of genomic damage.

In the current experiments, the disappearance of cells from SC and IM implantation sites suggested the possibility of their migration to other organs. However, our images showed no light-producing areas in the mice, other than those bearing the implants. Moreover, further luminometric analysis of tissue homogenates, a more sensitive procedure to detect luminescent cells, showed that after 12 weeks post-implantation there was no luciferase activity in lymph nodes, liver, brain, bones,

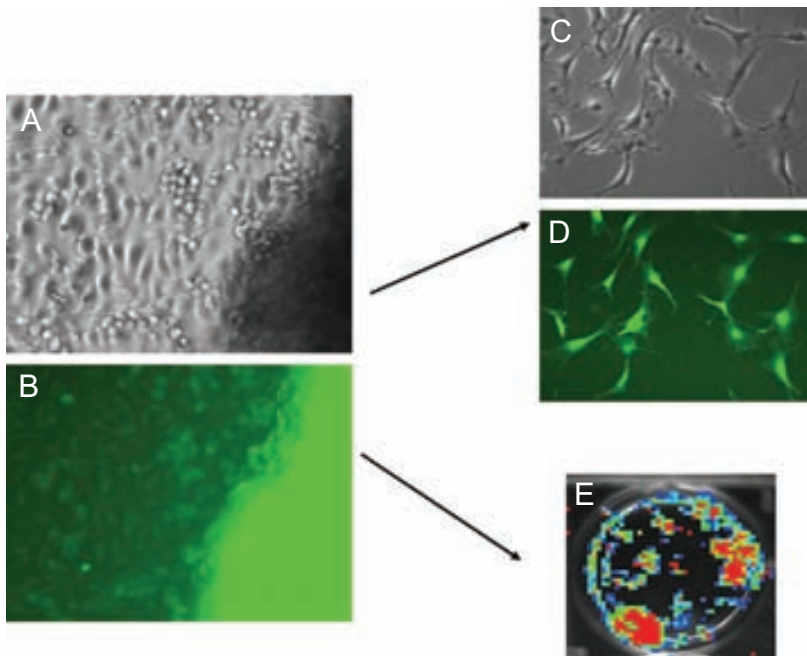


Fig. 8. Recovery of luminescent cells from scaffold implants. Images showing C3H/10T1/2.Cluc cells leaving a scaffold recovered from an intramuscular implantation site and incubated in growth medium (bulk green fluorescence is due to muscle collagen) (A, B) and after replating (C, D). Composite image showing luciferase photons from a culture of the recovered cells overlaid on the corresponding white light image of the plate (E). Light microscope and fluorescence images: magnification of A–D: objective: $20\times/0.4$, eyepiece: $10\times/20$; luminescence images were obtained using the Orca 2BT Imaging System.

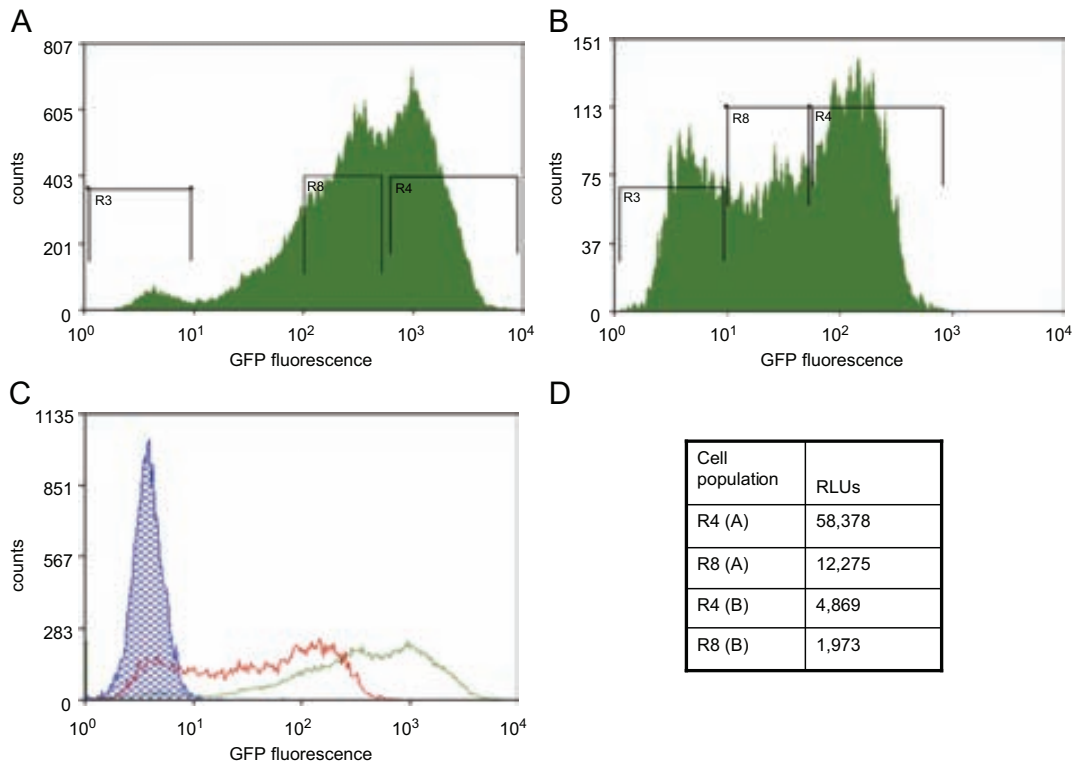


Fig. 9. Relative changes in fluorescence and luminescence of C3H/10T1/2.Pluc cells resulting from *in vivo* implantation plus subsequent *in vitro* cultivation for expansion. Panels A–C, FACS analysis of EGFP positive cells previous to seeding in scaffolds. The graph shows relative fluorescence intensity (X-axis) versus the number of counts (cells) before seeding in scaffolds (A) and after cell recovery from the implantation site (90 days *in vivo* growth plus 40 additional days for *in vitro* expansion (B) (R3 = non-fluorescent cells, R8 = low fluorescence cell fraction, R4 = high fluorescence cell fraction). Overlapped FACS analysis graph A (green line) and B (red line); the region corresponding to control cells non-virally transduced is shown shaded in blue (C). Luminometric values for Pluc activity of cells collected from the R4 and R8 regions in A and B (D).

lungs and spleen, indicating that the implanted cells had very little or no tendency to colonize other organs.

5. Conclusions

We demonstrate a methodological platform comprising viral expression vectors, stem cells and *in vivo* non-invasive imaging procedures to analyze stem cell–biomaterial combinations used for tissue repair in real life conditions. The approach is based on the use of non-invasive imaging to monitor the behavior of photoprotein-expressing progenitor cells seeded in scaffolds, which are then implanted in nude mice. The procedure is simple, sensitive and easy to implement. The possibility to perform repeated images of the same animal during extended periods of time and to analyze different material–cell combinations in the same animal improves data consistency and animal welfare, also resulting in savings of resources. This approach should facilitate the screening and development of scaffold materials, avoiding the difficulties associated

with *in vitro* assays, for the development of cell based therapies.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Oriol Juan and M^a Angeles Velasco for their help with the histology interpretations, and Dr. Ignasi Gich (Department of Epidemiology, Hospital Sant Pau) for his assistance with the statistical analysis of the data. This study was funded in part by grants from EU-FR6 Integrated Project GENOSTEM, La Marató TV3 and the Foundation and Red Temática de Investigación Cooperativa TERCEL Ministerio de Sanidad y Consumo.

Appendix A. Supplementary Materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jtbi.2004.11.017.

References

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–6.
- [2] Polak J, Hench L. Gene therapy progress and prospects: in tissue engineering. *Gene Ther* 2005;12:1725–33.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
- [4] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641–50.
- [5] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71–4.
- [6] Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A. Human bone marrow stromal cells: in vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials* 2006;27:6150–60.
- [7] Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P, Guicheux J. Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol Med* 2005;11:519–26.
- [8] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180–92.
- [9] Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV, Zander AR. High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2005;14:70–80.
- [10] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–28.
- [11] Zheng B, Cao B, Li G, Huard J. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng* 2006;12:1891–901.
- [12] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002;295:1009–14.
- [13] Niklason LE, Langer R. Prospects for organ and tissue replacement. *JAMA* 2001;285:573–6.
- [14] Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccacini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413–31.
- [15] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474–91.
- [16] Lee H, Teng S, Chen H, Lo W, Sun Y, Lin T, et al. Imaging human bone marrow stem cell morphogenesis in polyglycolic acid scaffold by multiphoton microscopy. *Tissue Eng* 2006;12:2835–41.
- [17] Campbell A, Sala-Newby G. Bioluminescent and chemiluminescent indicators for molecular signaling and function in living cells. In: Mason WT, editor. *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*. New York: Academic Press; 1996. p. 58–82.
- [18] Benaron DA, Cheong WF, Stevenson DK. Tissue optics. *Science* 1997;276:2002–3.
- [19] Müller G, Chance B, Alfano R. Medical optical tomography: functional imaging and monitoring. Bellingham, WA: SPIE Optical Engineering Press; 1993.
- [20] Matsumoto K, Anzai M, Nakagata N, Takahashi A, Takahashi Y, Miyata K. Onset of paternal gene activation in early mouse embryos fertilized with transgenic mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 1994;39:136–40.
- [21] Thompson EM, Adenot P, Tsuji FI, Renard JP. Real time imaging of transcriptional activity in live mouse preimplantation embryos using a secreted luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1317–21.
- [22] Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Dennery P, et al. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol* 1997;66:523–31.
- [23] Sweeney TJ, Mailander V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao Y, et al. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12044–9.
- [24] El Hilali N, Rubio N, Martinez-Villacampa M, Blanco J. Combined noninvasive imaging and luminometric quantification of luciferase-labeled human prostate tumors and metastases. *Lab Invest* 2002;82:1563–71.
- [25] de Boer J, van Blitterswijk C, Lowik C. Bioluminescent imaging: emerging technology for non-invasive imaging of bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:1851–8.
- [26] Klump H, Schiedlmeier B, Vogt B, Ryan M, Ostertag W, Baum C. Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy. *Gene Ther* 2001;8:811–7.
- [27] Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11400–6.
- [28] Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5413–8.
- [29] Srouji S, Maurice S, Livne E. Microscopy analysis of bone marrow-derived osteoprogenitor cells cultured on hydrogel 3-D scaffold. *Microsc Res Techn* 2005;66:132–8.
- [30] El Hilali N, Rubio N, Blanco J. Different effect of paclitaxel on primary tumor mass, tumor cell contents, and metastases for four experimental human prostate tumors expressing luciferase. *Clin Cancer Res* 2005;11:1253–8.
- [31] Rubio N, Villacampa MM, El Hilali N, Blanco J. Metastatic burden in nude mice organs measured using prostate tumor PC-3 cells expressing the luciferase gene as quantifiable tumor cell marker. *Prostate* 2000;44:133–43.
- [32] Krishnan M, Park JM, Cao F, Wang D, Paulmurugan R, Tseng JR, et al. Effects of epigenetic modulation on reporter gene expression: implications for stem cell imaging. *FASEB J* 2006;20:106–8.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Biomaterials 29 (2008) 427–437

Biomaterials

www.elsevier.com/locate/biomaterials

Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

Irene R. Décano^a, Marta Vilalta^a, Juli R. Bagó^a, Annette M. Matthies^{b,c},
Jeffrey A. Hubbell^{b,c}, Helen Dimitriou^d, Paolo Bianco^e, Nuria Rubio^a, Jerónimo Blanco^{a,*}

^aCardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Hospital de Sant Pau, Barcelona 08025, Spain

^bInstitute of Bioengineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

^cInstitute of Chemical Sciences and Engineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

^dDepartment of Pediatric Hematology-Oncology, University of Crete Medical School, Heraklion GR 71003, Crete, Greece

^eDepartment of Experimental Medicine and Pathology, Università La Sapienza, Viale Regina Elena 324 00161, Rome, Italy

Received 13 September 2007; accepted 3 October 2007

Available online 22 October 2007

Abstract

A combined strategy using bioluminescence imaging, bone densitometry and histology was used to analyze the bone regeneration capacity of human bone marrow (hBMSC) and adipose tissue (hAMSC) mesenchymal stem cells, seeded in an osteoconductive arginine–glycine–aspartate (RGD) crosslinked hydrogel scaffold, implanted in a mouse calvarial bone defect. We show that firefly luciferase labeled stem cells can be monitored *in vivo* through a prolonged 90 days period, during which hBMSCs survive better than hAMSCs and that the density of scaffold bearing defects increased significantly more than that of defects without scaffolds.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *In vivo* imaging; Cell differentiation; Scaffold; Luciferase; Enhanced green fluorescent protein (eGFP)

1. Introduction

Severe bone defects are still one of the skeletal tissue disorders without adequate treatment, a situation resulting from the lack of autologous bone for repair and insufficient clinically tested scaffold materials. Scaffolds not only provide adhesive substrates and physical supports for cells, but offer also the possibility of customization with cell signaling molecules and surface properties such as roughness, hydrophobicity, charge and chemical composition known to affect cell adhesion and function [1]. The ideal material for bone regeneration should be osteoconductive with three-dimensionally interconnected pores to support cell colonization, communication, and bone formation [2]. Although a large number of materials for bone engineering have been developed [3–5], only a few are currently being tested in critical size defects (CSD) [6] in suitable *in vivo*

location. Polyethylene glycol (PEG)-based hydrogels have good biocompatibility in many situations [7,8] and have been shown to sustain bone formation [9,10], with control of porosity [11] and good mechanical integrity. Of particular interest is the possibility of introducing pendant and crosslinking molecules provided with ligand functionalities, e.g., pendant arginine–glycine–aspartate (RGD) peptide for specific integrin surface receptors or crosslinking matrix metalloproteinase (MMP)-sensitive peptides to allow cell-specific proteolytic degradation [22].

Several studies have shown that the implantation of certain progenitor cell-scaffold combination can lead to better results in bone regeneration than the implantation of the scaffolds without cells [12,13]. Although stem cells isolated from other tissues have demonstrated osteogenic potential [14], human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) are ideal candidates for autologous bone repair due to their proven capacity to differentiate to bone, abundance and ease of isolation. Recently, it has been demonstrated that human adipose-derived mesenchymal

*Corresponding author. Tel.: +349355 65905; fax: +349355 65559.

E-mail address: jblancof@csic-iccc.santpau.es (J. Blanco).

stem cells (hAMSCs) [15] have bone differentiation capacity similar to that of hBMSCs, with the added advantage of higher abundance and easier extraction.

Currently available non-invasive imaging procedures, such as magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET) and bioluminescence imaging (BLI), among others, are allowing researchers to continuously assess the behavior of stem cells *in vivo*, facilitating the development of stem cell-scaffold combinations for therapy. BLI procedures [16–19] based on the generation of visible light photons by luciferase (Luc) reporters [21] introduced in live cells [20] provide excellent signal-to-noise ratios, due to the very low intrinsic bioluminescence of mammalian tissues and have already been used to assess the viability of stem cell-scaffold combinations. We have previously tested the use of BLI procedures to quantitatively analyze the proliferation behavior of a mouse embryonic mesenchymal cell line C3H/10T1/2 seeded in a RGD-containing, MMP substrate peptide-crosslinked PEG hydrogel implanted in nude mice [24].

In the present work we extend the use of the BLI procedure to non-invasively analyze the proliferation capacity of hBMSCs and hAMSCs seeded on a RGD-containing, MMP-substrate peptide-crosslinked PEG hydrogel [22] implanted in a nude mice calvarial bone defect as a model of bone repair.

2. Materials and methods

2.1. Lentivirus production

The lentiviral vector, containing the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene under the control of the simian virus SV40 promoter and the Luc gene (Promega Corporation, Madison WI) under the control of the cytomegalovirus promoter, was constructed by cloning a cassette containing both promoter/reporter-gene pairs between the ClaI and BamHI sites of the lentiviral vector Plox/Twfg, a gift of Dr. D. Trono (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland).

Human embryonic kidney cells 293T were used for viral production. Packaging cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM-hg) (Sigma, Steinheim, Germany), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 units/ml penicillin/streptomycin (P/S) (Sigma), and 2 mM hepes (Sigma). The day prior to transfection, 3×10^6 cells were seeded on 10 cm² poly D-lysine (Sigma) coated plates. For transfections, 15 µg of lentiviral vector DNA were mixed with 5 µg of viral envelope plasmid, 10 µg of packaging construct, 450 µl of water and 50 µl of 2.5 M CaCl₂, added to 500 µl of hepes-buffered saline solution 2X pH 7 and incubated at room temperature (RT) for 20 min. This DNA mixture was then added to the 293T cells and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 16 h. Cells were then washed with PBS and grown in the same medium without serum. After 48 h the culture medium was collected, centrifuged at 2000 rpm and filtered through a 0.45 µm filter (Corning, Bath, UK). The filtered medium was ultra-centrifuged using the SW41.Ti rotor at 26,000 rpm at 4 °C for 90 min in a L-100XP (Beckman Coulter, Fullerton, CA) ultracentrifuge. Pelleted virus were suspended with 50 µl of PBS 1X per each transfected plate and kept at –80 °C. Viral titration was performed using the HIV-1 p24 antigen Eia (Beckman Coulter) 96 test kit.

2.2. hAMSCs and hBMSCs isolation and viral transduction

hAMSCs were isolated, with patient consent, from human adipose tissue remnants discarded after cosmetic liposuction procedures. Liposyrates were rinsed in PBS 1X, suspended in one volume of collagenase I

(Sigma) solution and incubated at 37 °C for 30 min with agitation. Subsequently, one volume of DMEM-hg supplemented with 10% FBS was added and the cell suspension centrifuged at 450 g for 10 min. The pellet was washed in 50 µl of Ringer's buffer (Sigma), suspended in 10 ml of 0.16 M ammonium chloride (Sigma) and incubated 10 min at RT. Then, 40 ml of Ringer's lactate were added to the cell suspension and the solution was centrifuged at 450 g. Cells were plated at 5000 cells/cm² in DMEM-hg supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 units/ml P/S.

To isolate hBMSCs, remnant bone marrow samples, extracted for analytical purposes from young children, were layered over Ficoll-Hypaque (Sigma) gradients in order to isolate mononuclear cells. The plastic adhering cells were harvested and replated at 5000 cells/cm² in 25 cm² T-flasks (Corning) in MEM without nucleotides (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 200 mM L-glutamine, 100 U/ml P/S and 1 ng/ml fibroblast growth factor-2 (FGF, Abcys SA, Paris, France). Medium changes were performed twice per week. When the culture became confluent, cells were trypsinized and replated at 1000 cells/cm² with the same medium. The day prior to viral transduction, both cell types were plated at a density of 6.5×10^3 cells/cm² in 12 well plates.

For transduction an aliquot of viral particles (50 µl) prepared as described above was diluted in 1 ml of growth medium containing 10 µg/ml polybrene (Sigma) and added to the cells, MOI = 21 (infectious viral particles/cell). After 48 h in culture, virus containing medium was replaced by fresh medium and cells were allowed to grow. The highest 5% eGFP expressing hAMSCs (G.Luc-hAMSCs) and the highest 29% eGFP expressing hBMSCs (G.Luc-hBMSCs) was selected by FACS, expanded and used for seeding the scaffolds.

2.3. *In vitro* cell growth and differentiation

An aliquot of each cell type was maintained in culture to monitor cell growth and stability of Luc expression during the course of the experiment. To determine Luc expression, every 15 days cells were trypsinized, counted and an aliquot containing 2×10^5 cells was resuspended in reporter lysis buffer (RLB) 1X (Promega) and frozen at –80 °C. At the end of the experiment the collected samples were used to determine Luc activity and DNA concentration. To assess the differentiation potential, cells were induced with the corresponding differentiation medium and then assayed by tissue-specific staining. For osteogenic differentiation, cells were plated at a density of 1.5×10^4 cells/cm² and cultured with growth medium supplemented with 50 µg/ml L-ascorbic acid (Sigma), 0.15 mM sodium phosphate dibasic (Sigma) and 10^{-7} M dexamethasone (Sigma). For adipogenic differentiation, cells were plated at a density of 8×10^4 cells/cm² and cultured with growth medium supplemented with 10% FBS, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma), 60 µM indomethacin (Sigma), 10^{-6} M dexamethasone and 100 nM rosiglitazone (Caiman Chemical, Ann Arbor, Michigan). Medium was changed every 3 days during a 21 days period, after which cells were fixed and stained.

2.4. Luciferase assays

To determine Luc activity, 100 µl luciferin (Promega) and 20 µl of cell lysate were mixed and following a 2 s delay, light production was measured using a bench top luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany) during a 10 s integration period. Light measurements were expressed as relative light units (RLUs). *In vitro* light production capacity per cell was determined as the slope of the standard curve of RLUs vs. predetermined numbers of cells (10, 50, 250, 500 and 1000).

2.5. DNA quantification

DNA quantification was performed using the Quant-iT DNA Broad-Range Assay Kit (Invitrogen) following manufacturers instructions. Briefly, a working solution was prepared by diluting Quant-iT DNA BR

reagent 1:200 in Quant-iT DNA BR buffer and 200 μ l of this solution were loaded in microplate wells. Next, 10 μ l of either Quant-iT DNA BR standard or test DNA sample were added to separate wells and mixed. Fluorescence was measured using a microplate reader (Wallac VICTOR², PerkinElmer, Waltham, Massachusetts) using excitation/emission maxima \approx 510/527 nm.

2.6. Seeding of scaffolds

Hydrogels were prepared as published [23]. Briefly, 20 μ l of PBS were added to a pre-made 7% PEG–RGD frozen aliquot (mix 1). In a different tube, 49.6 μ l of triethanolamine (Fluka, St. Gallen, Switzerland) 0.3 M pH 8 were added to a pre-made aliquot of lyophilized MMP peptide crosslinker and then mixed with 20 μ l of either medium (scaffolds without cells), medium containing 2.5×10^6 G.Luc-hAMSC or 2.5×10^6 G.Luc-hBMSC cells. Following this, 132 μ l of the re-suspended PEG–RGD (mix 1) were added to the MMP peptide crosslinker mix, pipetted on a SigmaCote (Sigma) coated slide, covered with a second coated slide and held with clamps. The construct was placed in an incubator for 15 min at 37 °C, after which the hydrogel was removed from the cast, placed in fresh medium and incubated for 30 min at 37 °C. The scaffolds were then cultivated in growth medium during a 5 days period followed by 5 additional days in osteogenic medium, and then implanted.

2.7. Mice and scaffold implantation

Six-week-old BALB/c homozygous nude (nu/nu) mice were purchased from Charles-River (Wilmington, MA) and maintained in a specific pathogen-free environment throughout the experiment. All animal procedures were performed with the approval of the animal care committee of the Cardiovascular Research Center and the Government of Catalonia. Twelve-week-old nude mice were prepared for surgery by intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine (Merial, Duluth, GA) and 3.3 mg/kg xilacine (Henry Schein, Melville, NY), and a subcutaneous analgesic injection of 0.05 mg/kg buprenorphine (Schering-Plough, Kenilworth, NJ). The surgical site was cleaned with povidone-iodine (Braun, Melsungen, Germany). A sagittal midline incision was performed on the skin and the periosteum was then cut, exposing the calvarial bone. Two defects of 4 mm diameter (CSD) were performed in the calvarial bone of each mice using a sterile drill bit (Dremel, Racine, WI), avoiding perforation of the dura. The surgical area was cleaned with saline and each defect was filled, or not, with a 3.5 mm diameter \times 1 mm thickness hydrogel scaffold (previously cut from a stock scaffold using a 3.5 mm biopsy punch (Stiefel, Madrid, Spain) and attached with 3M VetbondTM (3M Animal Care Products, St Paul, MN). The incision was closed using absorbable sutures.

Twenty surgically treated mice were divided in two groups of 10 each. In each group of mice, one defect was filled with a cell seeded scaffold and the contralateral one was either filled with an un-seeded scaffold or it was left empty, as indicated in the diagram in Fig. 4. After 12 weeks the animals were sacrificed by cervical dislocation and samples of the defect area were harvested for analysis.

2.8. In vivo non-invasive BLI and image analysis

In vivo non-invasive BLI of engrafted nude mice was performed as described previously [24]. Briefly, mice anesthetized with ketamine/xilacine were subcutaneously (sc) inoculated with 50 μ l of D-luciferin (100 mg/kg, Promega) in the calvaria. The anesthetized mice were placed in the detection chamber of a high-efficiency ORCA-2BT Imaging system (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) provided with a C4742-98-LWG-MOD camera and a 512 \times 512 pixel, charge couple device (CCD) cooled at -80 °C at a distance of 247 mm from the camera objective (HFP-Schneider Xenon 0.95/25 mm). Two images were generated from each mouse, one using a light source inside the chamber to register the animal position and a second one, in total darkness, during

5 min to acquire photons from the light emitting cells. Imaging was performed routinely 5 min after substrate inoculation.

To correlate the number of photon counts (PHCs) in images with the corresponding number of cells in live animals, a standard plot of PHCs vs. cell number was generated for each cell type by imaging predetermined numbers of cells (5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5) sc implanted in the calvaria of nude mice. The slope of such standard plots represents the number of PHCs acquired/implanted cell.

2.9. Computerized axial tomography (TAC) imaging and analysis

To determine calvarial defect density, 2.5 mm TAC images without contrast were acquired using a third generation TAC EXEL 2400 ELITE tomograph (Philips, Madrid, Spain). Imaging conditions were 120 Kv, 315 mA/s, 240 mm scanning diameter, 2.1 s/image, 5.00 zoom. Defect density was calculated using the spine window and the ROI function, which provides the density of the image under the cursor, and compared with surrounding bone density. Bone defect densities at the indicated times (days 2, 47 and 92), were used to evaluate bone healing in the four test conditions (no scaffold, hydrogel without cells, hydrogel + G.Luc-hAMSCs and hydrogel + G.Luc-hBMSCs).

2.10. Cell migration

To determine migration of cells implanted within scaffolds to other tissues, mice brains were harvested after the 12 weeks *in vivo* period, homogenized and assayed to determine Luc activity as previously described [20].

2.11. Histology and immunostaining

In vitro induction of cell differentiation to the osteogenic and adipogenic pathways was determined by Alizarin red S and Oil red O staining, respectively, as previously described [25].

Calvarial bones, including the test defects, were harvested, washed with PBS, fixed in 4% formaldehyde (freshly made from paraformaldehyde, Merck), decalcified in 10% formic acid (Merck) using an ion-exchange resin (Amberlite IR-120, Sigma) for 24 h at room temperature and then embedded in paraffin. Some of the implants were separated from the bone, washed, fixed and embedded in paraffin. Hematoxylin–eosin and Von Kossa stained sections (5 μ m thick) were prepared from samples of bone + implant and implants alone [26]. For immunostaining of eGFP expressing cells, tissue sections were deparaffinized, rehydrated and washed in PBS. After blocking non-specific antibody binding sites, the sections were incubated 2 h at RT with the primary antibody (goat polyclonal anti eGFP, Abcam, Cambridge, UK) at a 1:100 dilution in PBS containing BSA 1% and Tween-20 0.1%. The washed sections were incubated with a secondary rabbit polyclonal anti goat IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Abcam) at a 1:200 dilution for 1 h at RT. HRP activity was detected with diaminobenzidine.

2.12. Statistical analysis

Data from defect densities and images were analyzed by a two-way ANOVA test using StatView version 5.0 (values of $p < 0.05$ were considered significant).

3. Results

3.1. In vitro behavior of G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs

The *in vitro* population doubling pattern of the labeled mesenchymal stem cells was characterized by a fast

growing phase of 5 days for both cell types G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs that lasted for 20 and 9 passages, respectively. This was followed by a replication slowdown to 8 days for G.Luc-hAMSCs during the rest of the cultivation period, while for G.Luc-hBMSCs duplication time increased to 10 days during two passages after which cells stopped growing. At passage 7 both cell types, G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs, retained their osteogenic and adipogenic differentiation potential (supplementary data Fig. 1) and were used for seeding the PEG–RGD scaffolds.

3.2. Light production *in vitro*

The light production capacity of cells in culture was measured in lysates from predetermined numbers of cells. Figs. 1(A) and (B) show standard plots of light production vs. cell number for each cell type. The slopes of the linear regression plots, the light production capacity/cell, expressed in RLUs corresponded to 144.9 and 27.2 RLUs/cell for G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs, respectively.

3.3. Stability of luciferase expression *in vitro*

To determine the stability of Luc expression, cell samples were regularly collected during a 12-week period of *in vitro* culture and assayed for light production as previously indicated. Figs. 1C and D show that light production capacity, expressed as the log (RLUs/ng of cell DNA) vs. cultivation time, was stable for both cell types G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs.

3.4. Light detection capacity *in vivo*

Mice were sc inoculated in the calvaria with predetermined numbers of Luc expressing cells and used for imaging. Plots of PHCs extracted from the images vs. the number of implanted cells (Figs. 2B and C) were linear (G.Luc-hAMSCs, $R^2 = 0.9636$ and G.Luc-hBMSCs, $R^2 = 0.885$). Images (Fig. 2A) showed that a minimum of 1000 G.Luc-hAMSCs and 5000 G.Luc-hBMSCs were needed for cell detection with the ORCA imaging system. The number of PHCs/cell that could be non-invasively detected (the slopes of the linear regression plots) was 137.28 for G.Luc-hAMSCs and 45.27 for G.Luc-hBMSCs.

3.5. Bioluminescence imaging (BLI)

Combinations of scaffold with and without labeled mesenchymal stem cells and no scaffold were implanted in the mouse calvarial defect, as described, and monitored during a 12-week period to analyze their light producing behavior. Prior to implantation, seeded scaffolds were observed by confocal microscopy to monitor the three-dimensional cell distribution (Fig. 3). Representative head images, from each test group are shown in Fig. 4 (the whole image set is in Figs. 2 and 3, supplementary data). Analysis of the images showed that four out of 10 scaffolds seeded with G.Luc-hAMSCs and seven out of 10 scaffolds seeded with G.Luc-hBMSCs, retained light producing cells by the end of the experiment. To quantify the proliferation behavior of cells in the scaffolds, PHCs extracted from the recorded images were background subtracted and

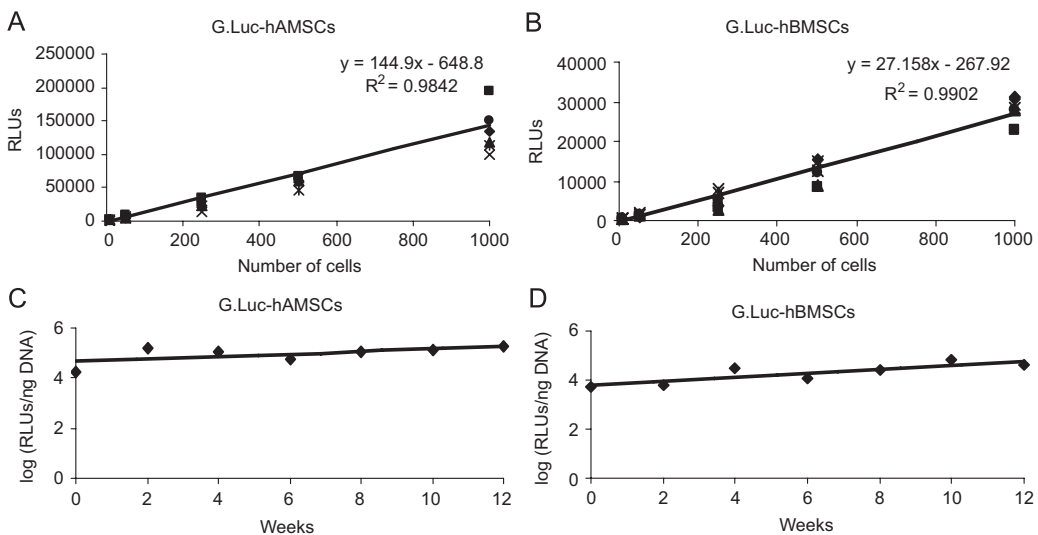


Fig. 1. *In vitro* light production capacity of G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs. Predetermined numbers, 10, 50, 250, 500 and 1000 of G.Luc-hAMSCs (A) and G.Luc-hBMSCs (B) were used, mixed with luciferin and analyzed for luciferase activity using a bench top luminometer, as described in methods. Light production is expressed as relative light units (RLUs). (Slope of regression plot = number RLUs/cell.) Stability of luciferase (Luc) expression *in vitro* (C,D). Cell samples from a continuous culture were collected every 2 weeks during a 12-week period and analyzed for Luc activity and DNA contents. G.Luc-hAMSCs (C) and G.Luc-hBMSCs (D). R = correlation coefficient.

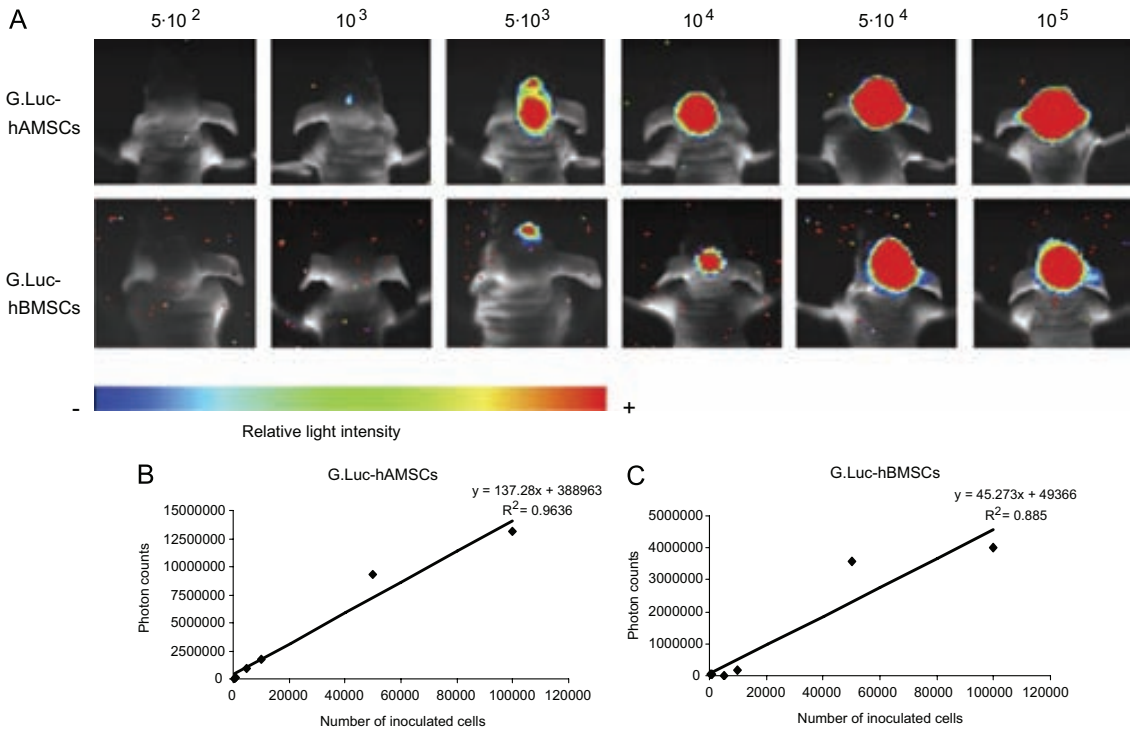


Fig. 2. *In vivo* detection sensitivity for G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs luminescence. (A) To determine the minimum number of detectable cells and the linearity of detected photons vs. number of cells, 0.5×10^3 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 cells from each cell type were inoculated subcutaneously in the calvaria of mice and imaged after injection of luciferin using a high sensitivity imaging system (Hamamatsu Photonics) as described. Lowest intensity = blue, highest intensity = red. (B,C) the plots show photon counts (PHCs) recorded in the images, after background subtraction, versus the number of inoculated cells. Slope of regression plot = number PHCs/cell. R = correlation coefficient.

plotted, vs. post implantation time, directly and after normalization (relative to PHCs at time=0) (Fig. 5). Normalization was used to facilitate visualization of data and to take into consideration variability in the number of cells seeded in the scaffolds. Analysis of light production during the experiment shows that in both groups of implanted mice, cells followed qualitatively similar growth patterns, characterized by a growth crisis during the first 30 days that was followed by stabilization in the number of cells until the end of the experiment. However, while for G.Luc-hBMSCs the initial growth crisis resulted in a overall drop of 63% in the number of surviving light producing cells relative to that originally implanted, G.Luc-hAMSCs suffered a considerably more pronounced growth crisis during the same time, with only 5% of the initially implanted cells surviving ($p = 0.0543$).

3.6. TAC imaging

Bone healing was quantitatively evaluated by densitometric analysis of changes in the X-ray images of experimentally induced bone defects, using TAC EXEL 2400 ELITE software that includes cursor and a ROI

function to define areas of interest. Fig. 6A is a typical X-ray image. The image shows that the bone defects spanned the full-thickness of the calvarial bone. Density values are expressed relative to air (-1000), brain tissue densities were between -3 and -10 and contiguous bone densities were between 170 and 230. Mean densities in each test groups, calculated and plotted vs. time are shown in Fig. 6B. Although defect density increased in all tested groups, none of them reached the original bone density at the end of the experiment. Bone defect density increases induced by G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs seeded scaffolds were similar and slightly higher than those produced by scaffolds without cells ($p = 0.09$). However, mice bearing cell seeded and unseeded scaffolds showed significantly different density increases in comparison with mice without scaffolds ($p < 0.05$). Defects left without scaffold showed the lowest, however detectable, density changes of all groups.

3.7. Cell migration

To determine if cells disperse from the scaffolds across the dura, brain lysates from the 20 mice were assayed for

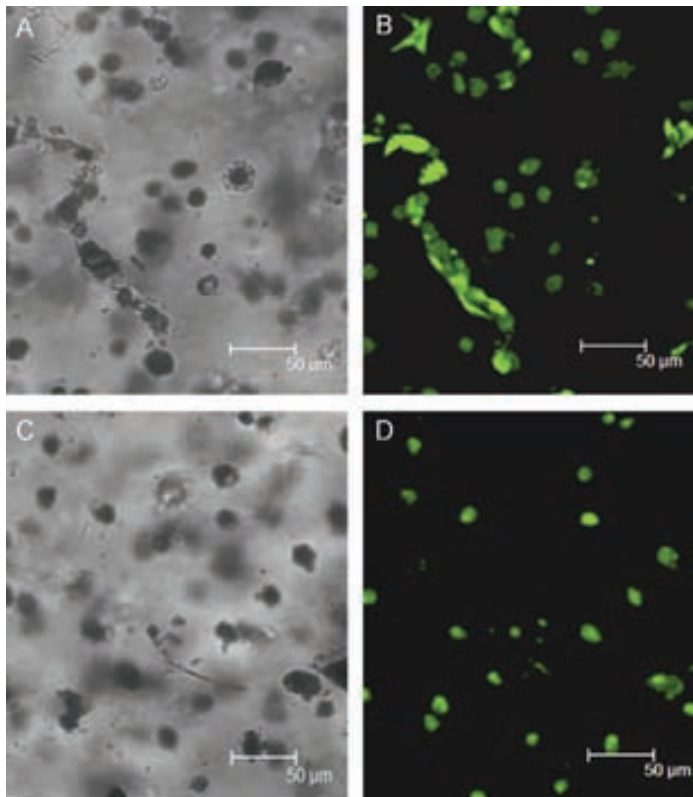


Fig. 3. Monitoring of PEG-RGD hydrogel scaffold seeding by confocal microscopy. Following seeding and cultivation *in vitro* but prior to implantation in the mice calvaria, representative PEG-RGD hydrogel + G.Luc-hAMSCs (A,B) and PEG-RGD hydrogel + G.Luc-hBMSCs (C,D) were imaged using a confocal microscope to determine cell density and homogeneity of distribution in the scaffolds (objective: 63 X/1.3, eyepiece: 10 X/20). (A,C) White light images, (B,D) fluorescence images (fluorescence microscopy excitation range for eGFP was from 515 to 560 nm and emission was at 590 nm).

Luc activity. Only one brain lysate, from a mouse bearing hydrogel + G.Luc-hBMSCs, showed marginal (1540 RLU) luminescence over background, corresponding to approximately 60 cells [27]. We presume this resulted from surgical failure with injury to the dura membrane.

3.8. Histology

At the end of the monitoring period, samples of light producing and non-producing implants were removed from calvarial bones and processed for histology. Sections were processed for hematoxylin–eosin and Von Kossa staining to detect cell colonization and mineralization (Fig. 7). Microscope observation of stained sections showed that the cell seeded scaffolds retained their structure and contained cells (Figs. 7A and B), while un-seeded scaffolds were extensively infiltrated by host cells and appeared more degraded (Fig. 7C). Von Kossa stained sections from both G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs seeded gels showed abundant dark stained silver precipitates, indicative of phosphate deposition (Figs. 7D and E), which were mostly absent in sections from un-seeded gels (Fig. 7F).

Bone defects that had not been filled with scaffolds showed no signs of regeneration (Fig. 8A). There were no clear indications of newly formed bone in calvarial defects filled with cell seeded scaffolds. However, scaffolds that had been seeded or not with cells showed structures with bone-like staining characteristics (Figs. 8B–D), possibly remnants of pre-existing bone. Immunostaining of the tissue sections also showed very rare eGFP positive cells in the vicinity of the seeded scaffolds (Figs. 8E and F).

Fluorescence confocal microscope observation of the samples before fixation revealed extensive colonization by green fluorescent cells having varied morphologies in the light emitting implants (Figs. 8G and H), however, few fluorescent cells were detected in implants that produced little or no light, in correlation with the *in vivo* BLI results.

4. Discussion

The aim of the current work was to develop a non-invasive BLI-based approach in combination with a model of calvarial bone repair to analyze the *in vivo* bone regeneration capacity of Luc expressing G.Luc-hAMSCs

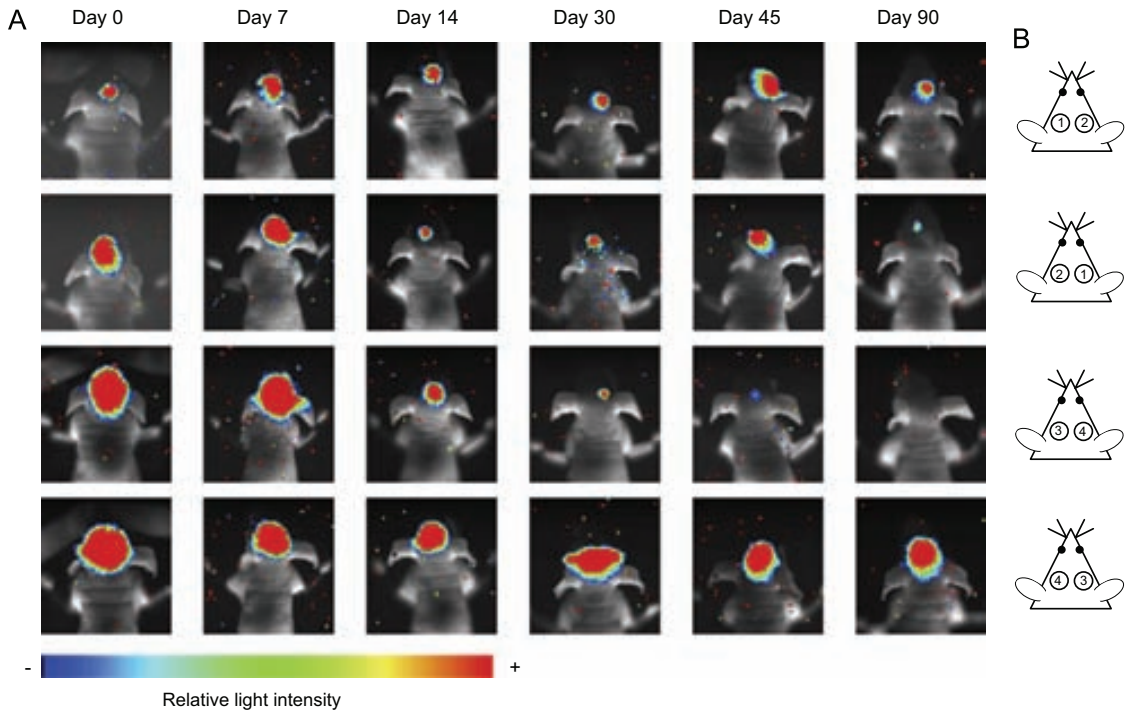


Fig. 4. Non-invasive BLI of representative nude mice calvarial defects with and without PEG-RGD hydrogel implants. (A) Composite images of photons from G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs, overlaid on the corresponding white light images of mice. Lowest intensity = blue, highest = red. (B) Diagram showing location of the PEG-RGD hydrogel implants in the mouse calvarial bone: control, no scaffold (1), hydrogel + G.Luc-hBMSCs (2), hydrogel without cells (3), hydrogel + G.Luc-hAMSCs (4). The whole data set (20 mice) can be found as supplementary data. The color bar shows the relative light intensity.

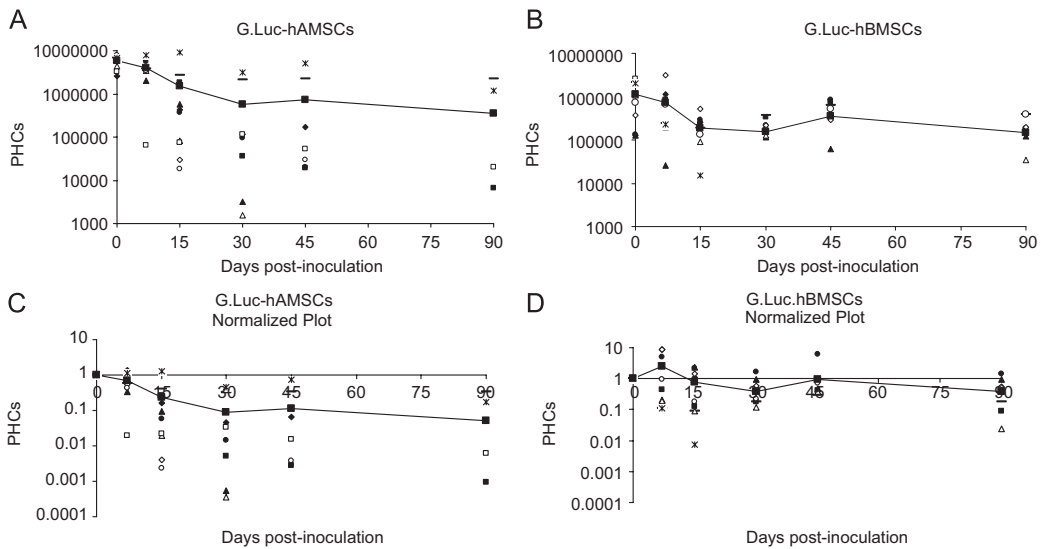


Fig. 5. Quantitative analysis BLI data. Recorded photon counts (PHCs) extracted from bioluminescence images of hydrogel + G.Luc-hAMSCs (A) and hydrogel + G.Luc-hBMSCs (B) were background subtracted and plotted versus time post-implantation. To facilitate analysis, PHCs were also plotted after normalization relative to those of day 0 (C,D). The solid line represents the average group value for each time point.

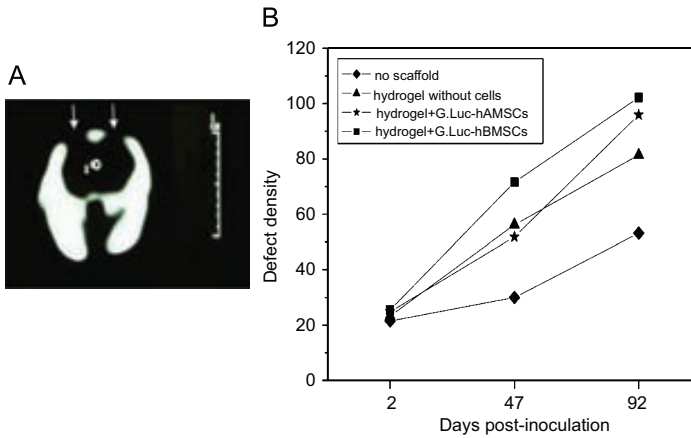


Fig. 6. TAC analysis of bone defects. (A) Typical TAC longitudinal image at day 0 showing calvarial bone including bone defects (arrows). (Small circle: ROI function used to define area of interest.) (B) Average of the recorded densities from each group of tested defects versus time.

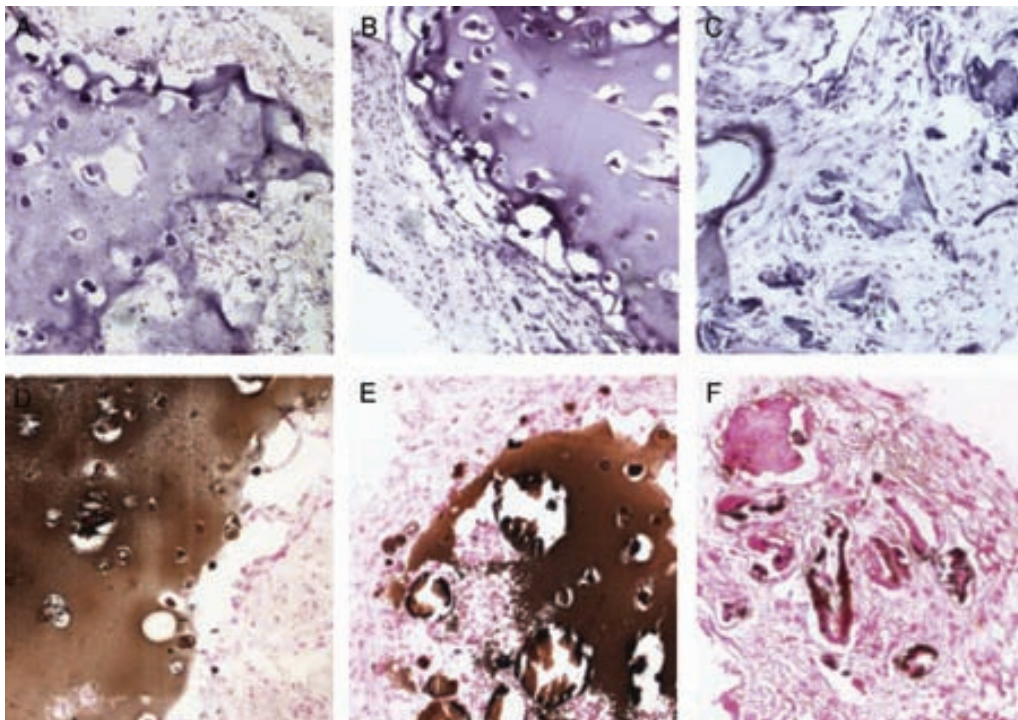


Fig. 7. Histological analysis of implants. (A–C) Hematoxylin–eosin stained sections from hydrogel+G.Luc-hBMSCs (A), hydrogel+G.Luc-hAMSCs (B) and un-seeded hydrogel (C). (D–F) Von Kossa stained sections from hydrogel+G.Luc-hBMSCs (D), hydrogel+G.Luc-hAMSCs (E) and un-seeded hydrogel (F). Images magnification $100\times$.

and G.Luc-hBMSCs, respectively using a PEG–RGD hydrogel scaffold.

We used a double reporter lentiviral vector containing eGFP and Luc genes under the control of SV40 and CMV

promoters, respectively, to label hAMSCs and hBMSCs for constitutive reporter expression. We show that *in vitro* both G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs generate quantities of photons (144.9 and 27.2, respectively) that correlate

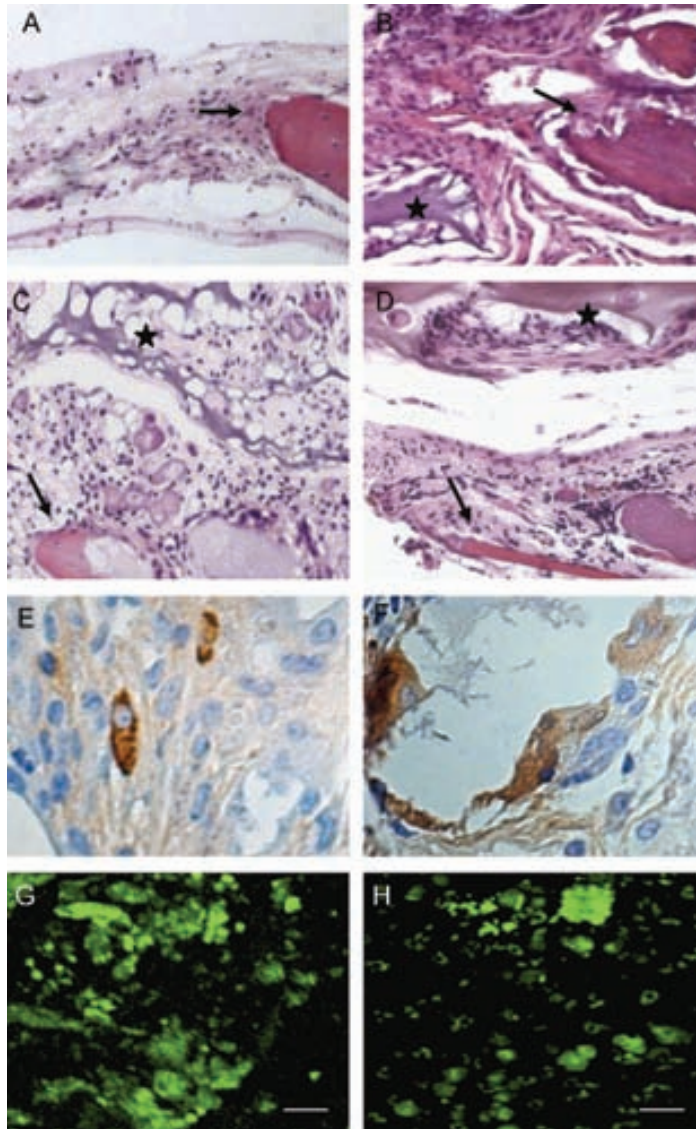


Fig. 8. Histological analysis of the calvarial bone defect. (A–D) Hematoxylin–eosin stained sections. (A) Bone defect without implant showing the edge of the calvarial bone (arrow), 100 \times . (B) Bone defect with un-seeded hydrogel (star) showing bone like structure (arrow), 200 \times . (C) Bone defect including hydrogel + G.Luc-hAMSCs (star) and bone like structure (arrow), 100 \times . (D) Bone defect including hydrogel + G.Luc-hBMSCs (star) and bone like structure (arrow), 100 \times . (E,F) Immunohistochemical detection of eGFP expressing cells. (E) eGFP positive cells in the edge of a hydrogel + G.Luc-hAMSCs implant, 400 \times . (F) eGFP positive cells in the host-hydrogel + G.Luc-hBMSCs interface, magnification 400 \times . (G,H) Confocal microscopy of seeded scaffolds after 90 days of implantation. (G) Hydrogel + G.Luc-hAMSCs. (H) Hydrogel + G.Luc-hBMSCs (objective: 63 X/1.3, eyepiece: 10 X/20. Fluorescence microscopy excitation range for eGFP was from 515 to 560 nm and emission was at 590 nm).

linearly with the number of cells analyzed. Thus, light emission could be used reliably to measure cell population densities.

Continuous monitoring of light production by cells in parallel cultures kept throughout the 90 days duration of the *in vivo* experiment showed that there was no reduction in the expression of the Luc reporter, indicating

that lentiviral vectors could be convenient labeling agents for stable long-term use, and that light production could be used to monitor and quantify the number of cells surviving in live animal implants. In contrast, cells labeled with Luc using retroviral vectors have shown a tendency to loose expression capacity after prolonged cultivation [24].

By BLI of predetermined numbers of cells seeded implanted in the calvaria of nude mice it was possible to establish lower detection sensitivity limits of as few as 1000 and 5000 cells for implanted G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs, respectively, and that there was a good linear correlation ($R^2 = 0.9636$ and 0.885 , respectively) between the number of implanted cells and the number of PHCs recorded in the images. Thus, BLI could be used to quantify changes in the number of cells implanted in the calvaria of mice.

To compare their bone regeneration capacity, G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs were seeded, *in vitro*, in RGD-containing, MMP substrate peptide-crosslinked PEG hydrogel scaffolds (RGD-PEG). This scaffold, consisting of four arm PEG macromers functionalized vinylsulfones, crosslinked with a peptide containing two cysteine residues flanking an MMP substrate sequence and also functionalized with a cysteine-containing RGD peptide [22], had previously shown good capacity to support bone repair [23]. The cell seeded scaffolds were implanted in 4 mm diameter bone defects, generated in the calvarial bone of immunodepressed mice and imaged throughout a 90 days period. Analysis of the acquired images showed that G.Luc-hBMSCs survived better than G.Luc-hAMSCs. In agreement with this, plots of image photon counts vs. time showed a common pattern of time related changes for both G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs, characterized by a cell growth crisis, during the first 30 days *in vivo*, that was followed by a stabilization of the number of surviving cells. However, while approximately 37% of the G.Luc-hBMSCs produced light until the end of the experiment, a clearly smaller proportion (5%) of the initially inoculated G.Luc-hAMSCs survived *in vivo* in the same time interval ($p = 0.058$), suggesting that the former could be a more effective tool for bone repair.

Since differentiating cells replicate slowly, the observed stabilization of light production by the implanted cells could indicate a transition in the differentiation stage. Thus, TAC scans, performed throughout the monitoring period, indicated that the calvarial bone defect regions containing the scaffolds, regardless of whether they had been seeded with cells or not, were significantly ($p < 0.05$) more dense than the calvarial defects left empty. There were also differences, however less significant ($p < 0.1$), between the densities of defects that had been implanted with cell seeded scaffolds and those implanted with scaffolds without cells. No significant differences were found between defects implanted with G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs seeded scaffolds. The density increase observed in defects without scaffolds is likely the result of fibrous tissue filling the space and regenerated periosteum as no bone like structures were detected.

Histological examination of the scaffold material alone or the defect area, including the scaffold material, when applicable, showed that G.Luc-hAMSCs and G.Luc-hBMSCs implanted scaffolds that produced light until the end of the experiment were populated by green fluorescent cells. Originally un-seeded scaffolds were also

colonized by cells derived from the host, in agreement with previously published data [23]. Empty defects showed occupation of the space by fibrous material.

Although Von Kossa staining of sections from cell seeded scaffolds recovered from calvarial defects showed large patches of silver deposition, which were mostly absent from equivalent un-seeded scaffolds, no evidence of newly formed bone could be firmly established.

5. Conclusions

We show that a BLI-based strategy can be used in combination with a mouse calvarial defect model to analyze the bone regeneration capacity of different types of stem cells and scaffold materials. We find that BLI can be effectively used to monitor and quantify the proliferation state of Luc expressing stem cells seeded in osteoconductive hydrogel scaffolds during prolonged periods of time (90 days). Although G.Luc-hBMSCs appear to survive better in the scaffolds than G.Luc-hAMSCs, increments in tissue density induced by both cell types were similar and higher than those generated by scaffolds without stem cells. Density changes induced in defects containing any of the scaffold-cell combinations were significantly higher than those from defects without scaffolds. These density changes correlated with the presence in the scaffolds of Luc expressing cells and mineralization, as detected by metallic silver deposition. However, there was no clear histological evidence of new bone formation.

This approach should be valuable to analyze many technical issues related to the use of stem cells for tissue repair, optimum cell types, *in vitro* expansion conditions, induction of differentiation, requirements for optimum scaffold material, etc. The introduction of further refinements to these procedures, such as the use of tissue-specific promoters to regulate expression of Luc reporters, should facilitate the resolution of these pending issues in the immediate future.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Dr. Oriol Juan and Ma Angeles Velasco for their help with the histological protocols, Dr. Xavier Roura (Hospital Clinic Veterinari, Universitat Autònoma de Barcelona) for his assistance with TAC imaging and analysis, Dra. Sarah Maurice (from Dra. Erella Livne group, Haifa, Israel) for teaching the calvarial bone regeneration model, Giuseppe Di Lullo and Mara Riminucci (from Dr. Paolo Bianco group, Rome, Italy) for their help with histological staining and interpretation and Álex Peralvarez (Stockholm University, Sweden) for helpful assistance on preparation of Fig. 5.

This study was funded in part by Grants from EU-FP6 Integrated Project GENOSTEM, La Marató TV3 Foundation, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) and Red

Temática de Investigación Cooperativa TERCEL Ministerio de Sanidad y Consumo.

Appendix A. Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.atmosenv.2007.05.058.

References

- [1] Bottaro DP, Liebmman-Vinson A, Heidaran MA. Molecular signaling in bioengineered tissue microenvironments. *Ann N Y Acad Sci* 2002;961:143–53.
- [2] Cowan CM, Soo C, Ting K, Wu B. Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 2005;66:239–85.
- [3] Kumarasuriyar A, Jackson RA, Grondahl L, Trau M, Nurcombe V, Cool SM. Poly(beta-hydroxybutyrate-co-beta-hydroxyvalerate) supports in vitro osteogenesis. *Tissue Eng* 2005;11:1281–95.
- [4] Bonzani IC, Adhiraki R, Houshyar S, Mayadunne R, Gunatillake P, Stevens MM. Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2007;28:423–33.
- [5] Silva GA, Coutinho OP, Ducheyne P, Shapiro IM, Reis RL. The effect of starch and starch-bioactive glass composite microparticles on the adhesion and expression of the osteoblastic phenotype of a bone cell line. *Biomaterials* 2007;28(2):326–34.
- [6] Hollinger JO, Winn S, Bonadio J. Options for tissue engineering to address challenges of the aging skeleton. *Tissue Eng* 2000;6:341–50.
- [7] Kim HJ, Kim UJ, Vunjak-Novakovic G, Min BH, Kaplan DL. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* 2005;26:4442–52.
- [8] Chen F, Mao T, Tao K, Chen S, Ding G, Gu X. Injectable bone. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41:21–8.
- [9] Anseth KS, Bowman CN, Brannon-Peppas L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* 1996;17:1647–57.
- [10] Working PK, Newman MS, Johnson J, Cornacoff JB. Safety of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene glycol) derivatives. Poly(ethylene glycol): chemistry and biological applications. *Am Chem Soc* 1997;45–57.
- [11] Mettler L, Audebert A, Lehmann-Willenbrock E, Schive K, Jacobs VR. Prospective clinical trial of SprayGel as a barrier to adhesion formation: an interim analysis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2003;10:339–44.
- [12] Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998;16:155–62.
- [13] Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder S. Culture-expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng* 1997;3:173–85.
- [14] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells 2002;13:4279–95.
- [15] Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab* 2007;53:81–4.
- [16] Schuster DP, Kovacs A, Garbow J, Pivnicka-Worms D. Recent advances in imaging the lungs of intact small animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:129–38.
- [17] Sadikot RT, Blackwell TS. Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:537–40.
- [18] Deroose CM, De A, Loening AM, Ray P, Chatzizoiannou AF, Gambhir SS. Multimodality imaging of tumor xenografts and metastases in mice with combined small-animal PET, small-animal CT, and bioluminescence imaging. *J Nucl Med* 2007;48:295–303.
- [19] Drake JM, Gabriel CL, Henry MD. Assessing tumor growth and distribution in a model of prostate cancer metastasis using bioluminescence imaging. *Clin Exp Metastasis* 2005;22:674–84.
- [20] El Hilali N, Rubio N, Blanco J. Different effect of paclitaxel on primary tumor mass, tumor cell contents, and metastases for four experimental human prostate tumors expressing luciferase. *Clin Cancer Res* 2005;11:1253–8.
- [21] Cao YA, Bachmann MH, Beilhack A, Yang Y, Tanaka M, Swijnenburg RJ, et al. Molecular imaging using labeled donor tissue reveals patterns of engraftment, rejection, and survival in transplantation. *Transplantation* 2005;80:134–9.
- [22] Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5413–8.
- [23] Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schence JC, Kohler T, Müller R, et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol* 2003;21:513–8.
- [24] Roman I, Vilalta M, Rodriguez J, Matthies AM, Srouji S, Livne E, et al. Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by in vivo non-invasive photonic imaging. *Biomaterials* 2007;28:2718–28.
- [25] Price EM, Prather RS, Foley CM. Multipotent adult progenitor cell lines originating from the peripheral blood of green fluorescent protein transgenic swine. *Stem Cells Dev* 2006;15:507–22.
- [26] Kim MS, Kim SK, Kim SH, Hyun H, Khang G, Lee HB. In vivo osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells in thermosensitive MPEG-PCL diblock copolymer gels. *Tissue Eng* 2006;12:2863–73.
- [27] Rubio N, Villacampa MM, El Hilali N, Blanco J. Metastatic burden in nude mice organs measured using prostate tumor PC-3 cells expressing the luciferase gene as a quantifiable tumor cell marker. *Prostate* 2000;44:133–43.