



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
QUÍMICOBIOLOGICAS**

**“ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO  
PARA LA OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y  
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES  
MESENQUIMALES A OSTEÓBLASTOS DE PACIENTES CON  
OSTEOSARCOMA”.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN:

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICOBIOLOGICAS**

PRESENTA

**Q.F.B. LEONARDO FERMIN ACEVEDO OLVERA**



MEXICO, D. F .

2010

# DEDICATORIAS

---

*A DIOS, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera profesional.*

*A MI PAPA Y MAMA, por ser los mejores y estar conmigo incondicionalmente, gracias porque sin ellos y sus enseñanzas no estaría aquí, ni sería quien soy ahora, a ellos les dedico esta tesis.*

*A MIS HERMANOS, que son parte de una familia unida, que siempre me han apoyado en los momentos difíciles. Siempre contarán conmigo.*

*A LA MEMORIA DE MIS ABUELITAS, por los momentos que hoy son recuerdos.*

*A LA FAMILIA GUTIÉRREZ IGLESIAS, como un testimonio de eterna gratitud, porque siempre me han brindado una solución en los momentos difíciles de mi vida, mil gracias.*

*A ELY, porque eres una persona que me comprende y me ha brindado todo su apoyo durante los años más difíciles y más felices de mi vida; así que, este logro mío, es un logro tuyo.*

*A ELY, CARI, BETO YGIS, como un testimonio de gratitud, porque sin su apoyo en todos los ámbitos, no hubiera sido posible la culminación de mi maestría.*



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE INGENIERIA DE TEJIDOS DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GOMEZ Y EN EL DEPARTAMENTO DE “INMUNOLOGÍA”, DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. IPN. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ETHEL GARCÍA LATORRE, EL DR. ALBERTO PARRA BARRERA Y LA DRA. ATLANTIDA MARGARITA RAYA RIVERA.

ESTA TESIS ES PARTE DEL PROTOCOLO DE INGENIERÍA DE HUESO, PARA REEMPLAZO DE HUESOS LARGOS. DEL HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ: HIM/2007/023

EL AUTOR REALIZÓ UNA ESTANCIA EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. GISELA GUTIERREZ IGLESIAS,

EL AUTOR CONTO CON EL APOYO DE BECA TESIS DE AGOSTO A DICIEMBRE DEL 2009 Y BECA PIFI: SIP 20080681 AGOSTO A DICIEMBRE DEL 2008, Y SIP 20091236 DE FEBRERO-JUNIO Y AGOSTO-DICIEMBRE.

# AGRADECIMIENTOS

---

*A MIS ASESORES: Dra. Ethel y Dr. Alberto, a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr la realización de esta tesis.*

*A LOS MIEMBROS DEL JURADO:*

*Dra. Ehel Awilda García Latorre*

*Dr. Alberto Parra Barrera*

*Dra. Elba Reyes Maldonado*

*Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios*

*Dra. Concepción Sánchez Gómez*

*Dra. María Lilia Domínguez López*

*Por todas sus sugerencias, las cuales enriquecieron este trabajo.*

*A LA DRA. RAYA, por permitirme ser parte de este proyecto, con el cual culmino una fase más en mi vida profesional, y haber apoyado durante la realización de este proyecto, por lo cual, le estaré agradecido.*

*AL DR. ALBERTO, porque gracias a su amistad, confianza y estímulos brindados durante mi formación académica, me han ayudado a superar los obstáculos que se me han presentado y he superado una de mis metas, mil gracias.*

*DRA. GISELA, por permitirme ser parte de los proyectos de este laboratorio y por todo el apoyo brindado en los momentos difíciles, con consejos y estímulos, que sin su ayuda no estaría en esta fase de mis estudios.*

*DRA. SANCHEZ, porque, gracias a sus invaluables sugerencias, me han orientado y enriquecido esta tesis.*

*AL DR. MILIAR, por permitir mi estancia en el laboratorio de biología molecular y adquirir nuevos conocimientos en mi formación académica.*

*A LA Q. EMMA, por todo el apoyo brindado en la realización de esta tesis.*

*A LOS AMIGOS DEL HIM: Dr. Esquiliano, Dr. Guillermo, M en C. Francisco, Ivan, Raquel, Ma. Elena, por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.*

*A MIS MAESTROS DE LA ENCB: Dra. Ethel, Dra. Elba, Dr. Hernández, M en C. Leonila, gracias a cada uno de ellos porque, me han dado las bases para mi formación académica y sin su ayuda, no estaría en donde me encuentro ahora.*

*A MIS AMIGOS DEL ENCB: Edder, Selene, Ma. Elena, por sus consejos, amistad y por todo el apoyo que me han brindado.*

# INDICE

---

	Abreviaturas.....	i
	Figuras y tablas.....	ii
	Resumen.....	iii
	Abstract.....	iv
I.	Introducción.....	1
I.I	Estructura ósea.....	1
I.II	Células osteoprogenitoras.....	1
I.III	Osteoblastos, Osteocitos y Osteoclastos.....	2
I.IV	Alteraciones óseas.....	3
I.V	Osteosarcoma.....	3
I.VI	Ingeniería de tejidos o medicina regenerativa.....	5
I.VII	Alternativas terapéuticas en la regeneración ósea.....	6
I.VIII	Células madre.....	6
I.IX	Células troncales mesenquimales.....	8
I.X	Osteogénesis.....	9
I.X.I	Dexametasona.....	10
I.X.II	$\beta$ -Glicerofosfato.....	10
I.X.III	Acido ascórbico.....	10
I.XI	Marcadores de formación ósea.....	11
I.XI.I	Fosfatasa alcalina.....	11
I.XI.II	Osteocalcina.....	11
I.XI.III	Colágeno tipo I.....	12
I.XI.IV	Otras proteínas no colágenos de la matriz ósea.....	12
I.XII	Factores de Crecimiento.....	13
I.XII.I	Mecanismo de Acción.....	13
I.XII.II	Funciones de los FCs en las células osteogénicas.....	14
II.	Justificación.....	18
III.	Hipótesis.....	20
IV.	Objetivos.....	21
V.	Material y método.....	22
VI.	Resultados.....	28
VII.	Discusión.....	38
VIII.	Conclusiones.....	43
IX.	Bibliografía.....	44

# ABREVIATURAS

---

ALP ó AFA = Actividad de fosfatasa alcalina  
BMP-7 = Proteína morfogénica de hueso-7  
BP = Proteínas transportadoras o de unión  
CTM = Células troncales mesenquimales  
CTMMO= Células troncales mesenquimales de médula ósea  
DEXA = Dexametasona  
DMEM= Medio dulbecco modificado de eagle  
EGF = Factor de crecimiento epidérmico  
FCs = Factores de crecimiento  
FGFb = Factor básico de crecimiento fibroblástico  
FT = Factor de transcripción  
Hanks = Solución salina Hanks  
IGF-I = Factor de crecimiento tipo Insulina-I  
IGFBPs = Proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina  
MEC = Matriz extracelular  
MTT = Azul de tetrazolio  
MSC = Mesenchymal stem cells  
OP-1 = Proteína osteogénica -1  
PBS = Solución salina amortiguadora de fosfatos  
PE-1 = Prostaglandina E-1  
SFB = Suero fetal de bovino  
TK = Tirosina-cinasas  
 $\alpha$ -MEM = Medio mínimo esencial alfa  
 $\beta$ -GP =  $\beta$ -Glicerofosfato

# FIGURAS Y TABLAS.

---

Figura 1. Diferenciación de las células troncales mesenquimales de MO.

Figura 2. Morfología de las células mononucleares adherentes de MO.

Figura 3. Diferenciación de las células de MO hacia adipocitos.

Figura 4. Caracterización por inmunohistoquímica de las células CTMMO.

Figura 5. Caracterización por citometría de flujo de las células de CTMMO.

Figura 6. Caracterización de las CTMMO diferenciadas a osteoblasto por la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y determinación de la proliferación a los 5, 12 y 20 días de cultivo *in vitro*.

Figura 7. Caracterización de los CTMMO diferenciadas a osteoblasto por FACS.

Figura 8. Caracterización por Inmunohistoquímica de las CTMMO diferenciadas a osteoblastos.

Tabla 1. Expresión de la fluorescencia emitida por los marcadores de diferenciación osteoblastica

# RESUMEN

---

Las células troncales mesenquimales (CTM ó MSCs) son capaces de auto replicarse y diferenciarse hacia una variedad de estirpes celulares incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales, musculares y recientemente descrito, a células neuronales. Por sus características como viabilidad, multipotencialidad, plasticidad y la capacidad de auto-renovación, las hace teóricamente la primera elección para el tratamiento de muchas enfermedades, así como en la reparación y regeneración de tejido óseo. Por otro lado, diversos factores de crecimiento potencializan la diferenciación y regeneración ósea *in vitro*, dentro de los cuales se incluyen: el BMP-7, IGF-1, EGF, FGFb y PE-1. El objetivo del presente estudio fue realizar un análisis comparativo por separado de tres condiciones de cultivo para la proliferación y diferenciación de las células troncales mesenquimales de médula ósea de pacientes con osteosarcoma (CTMMO), hacia osteoblastos con: 1) medio osteogénico, compuesto por  $\alpha$ -MEM, dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato y SFB al 15%; 2) medio diferenciador, el cual es un medio comercial (NH OsteoDiff Médium, Miltenyi Biotec); y 3) medio osteogénico suplementado por separado, con cada uno de los factores de crecimiento: FGFb, EGF, IGF-I, BMP-7 y PE-1. Los experimentos realizados revelaron un mayor efecto en la proliferación y diferenciación con el medio osteogénico adicionado con factores de crecimiento; tal es el caso del medio osteogénico adicionado con EGF (10ng/mL) o la PE-1 (35ng/mL) los cuales mostraron un efecto proliferativo y en presencia del FGFb (5 ng/mL), se observó un efecto diferenciador, con un incremento significativo en la actividad de fosfatasa alcalina. Por lo cual, la mejor condición de cultivo para diferenciar las CTMMO hacia osteoblastos es el medio osteogénico suplementado con FGFb.

# ABSTRACT

---

Mesenchymal stem cells (MSCs or CTM) are able to self replicate and differentiate into a variety of cell lineages, including osteoblast, chondrocytes, adipocytes, endothelial cells, muscle, and recently described into neuronal cells. Due to its characteristics and viability multipotency plasticity and the capacity for self-renewal, theoretically makes the first choice for the treatment of many diseases, as well as repair and regeneration of bone tissue. Moreover, various growth factors potentiate the differentiation and bone regeneration *in vitro*, among which include: the BMP-7, IGF-1, EGF, bFGF and PE-1. The aim of this study was to conduct a comparative analysis of three separate culture conditions for proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow of patients with osteosarcoma (CTMMO) to osteoblasts with: 1) osteogenic medium, composed by  $\alpha$ -MEM, dexamethasone,  $\beta$ -glycerophosphate and 15% FBS, 2) differentiator medium, which is a commercial medium (NH OsteoDiff Medium, Miltenyi Biotec), and 3) supplemented osteogenic medium, separately with each of the growth factors: bFGF, EGF, IGF-I, BMP-7 and EP-1. Experiments showed a greater proliferative effect and differentiating with osteogenic medium with added growth factors, such is the case of the supplemented medium osteogenic with EGF (10ng/mL) and PE-1 (35ng/mL) which showed a proliferative effect higher than the other conditions, and in the presence of bFGF (5ng/mL) showed an effect on osteoblast differentiation, with a significant increase in alkaline phosphatase activity. Therefore, the best culture conditions to differentiate CTMMO into osteoblasts is osteogenic medium supplemented with bFGF.

# I. INTRODUCCIÓN

---

## ***ESTRUCTURA ÓSEA***

El hueso constituye gran parte del esqueleto humano, gracias a su resistencia, es la malla sobre la cual, los tejidos blandos se unen y actúan en conjunto para producir movimientos (Alberts, et al. 2002; Ham, et al. 1985). Es un tejido conectivo calcificado, donde están incluidos los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, quienes se encargan de la síntesis, mantenimiento y resorción de la matriz calcificada (Durup, et al. 2006; Estrada y cols. 2006). Está cubierto en su superficie externa por tejido conectivo osteógeno especializado, llamado *periostio*; este contiene células capaces de diferenciarse en osteoblastos y producir hueso. La superficie interna, también está cubierta por una delgada capa celular, llamada *endostio*, el cual, también posee capacidad osteogénica (Ham, et al.1999; Durup, et al. 2006; Estrada y cols. 2006)

Se reconocen cuatro tipos celulares en el crecimiento óseo activo y son:

- La célula osteoprogenitora
- El osteoblasto
- El osteocito
- El osteoclasto

## ***CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS***

Se encuentran sobre la capa interna del periostio adyacente a la superficie externa del hueso, en el endostio, el cual recubre los conductos de Havers y sobre la trabécula de la matriz cartilaginosa de las metáfisis óseas en crecimiento. Estas células son consideradas como un precursor de los osteoblastos y células de revestimiento óseo, son células alargadas, con núcleo oval, y tienen un citoplasma acidófilo o ligeramente basófilo. Proliferan durante el periodo de crecimiento óseo, pero comienzan a ser menos activas durante la vida adulta (Durup, et al. 2006; Estrada y cols. 2006). También son consideradas como pre-osteoblastos, las cuales comparten características fenotípicas comunes de osteoblastos, como

actividad de fosfatasa alcalina, pero estas células no expresan todos los marcadores de osteoblastos maduros (Handschel, et al. 2006).

### ***OSTEOBLASTOS, OSTEOCITOS Y OSTEOCLASTOS.***

Los osteoblastos maduros, son caracterizados por la capacidad de sintetizar activamente matriz ósea, la cual finalmente se mineraliza; también expresan varios marcadores fenotípicos como gran actividad de fosfatasa alcalina, síntesis de colágeno (principalmente tipo I), y proteínas de matriz ósea no-colágenos como osteocalcina y osteopondina. Los osteoblastos expresan receptores para varias hormonas, vitamina D<sub>3</sub>, estrógeno y glucocorticoides, los cuales se involucran en la regulación de la diferenciación osteoblastica (Handschel, et al. 2006). La matriz ósea no calcificada se conoce como *osteoides* y posteriormente los osteoblastos agregan el fosfato de calcio a la matriz osteoide para formar hueso.

Los osteoblastos son células polarizadas, es decir, tienen una cara plana adyacente a la superficie ósea y una superficie libre distal redondeada (Ham, et al. 1985); además son los precursores de los osteocitos y cuando la actividad sintética de los osteoblastos disminuye, las células se aplanan y desaparece su basofilia, y decrece su actividad enzimática. Conforme los osteoblastos se incluyen en la matriz que están produciendo, desarrollan prominencias largas y delgadas denominadas pseudópodos, estos permiten que se mantengan en contacto con los osteoblastos vecinos, los cuales también se convierten en osteocitos. Con el curso de su inclusión en la matriz, las prominencias quedan cerradas, formando canalículos en donde residirán hasta que queden al descubierto durante la remodelación o reparación ósea. (Alberts, et al. 2002).

Una vez que los osteoblastos están incluidos en la matriz se denominan osteocitos, estos adquieren una morfología estrellada, con varias prominencias delgadas y se nutren por medio de los diminutos canalículos y pseudópodos osteocíticos encapsulados (Estrada y cols. 2006). Estos osteocitos son las células de hueso más abundantes, porque hay 10 veces más osteocitos que osteoblastos (Handschel, et al. 2006).

Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas, que miden 100 µm de diámetro y pueden contener hasta 50 núcleos. Siempre se localizan en sitios de resorción ósea (Durup et al. 2006).

### ***ALTERACIONES OSEAS***

Existe una enorme cantidad de alteraciones óseas causadas por traumas, tumores y enfermedades congénitas, etc., dentro de las cuales, los tumores óseos son los de mayor importancia médica y requieren un tratamiento clínico preciso (Estrada y cols. 2006).

Los tumores óseos varían por su aspecto, tamaño y sus características histológicas y biológicas; oscilan desde lesiones inocuas, hasta un proceso rápidamente mortal (Robbins, et al. 2008).

En general, los tumores fibrosos y productores de matriz son los más frecuentes. Excluyendo a las neoplasias malignas de origen medular (mieloma, linfomas y leucemias), el osteosarcoma es el cáncer primario de hueso más frecuente (Durup et al. 2006, Robbins, et al. 2008).

### ***OSTEOSARCOMA***

Es un tumor óseo maligno, que se origina en las células óseas y se asienta principalmente sobre la metáfisis de los huesos largos, en especial en el extremo distal del fémur y en el extremo proximal de la tibia y húmero (Lane, et al. 1986; Marinna, et al. 2004; Janes-Hedder 2002; Pierz, et al. 2001). Aproximadamente el 50% de los casos se originan en el área alrededor de la rodilla y menos del 10% presenta osteosarcoma en la pelvis (Mejía y cols. 2002).

Anualmente se diagnostica en aproximadamente 400 sujetos menores de 20 años en USA (Marinna, et al. 2004). En los adolescentes, es el tercer tipo más común de cáncer después de las leucemias y los linfomas (Janes-Hedder 2002). En México (2002), se reporta que de los niños y adolescentes derechohabientes del IMSS, el 74% de los casos identificados con un tumor óseo presentaron osteosarcoma y que los tumores óseos constituyen la séptima causa de muerte por cáncer (Hoffer, et al. 2002; Martínez y cols. 2004). La causa del osteosarcoma

aún no se conoce, diversos estudios lo han asociado con el retinoblastoma y se presupone una anomalía genética que predispone a los niños a estos tipos de cáncer (Lane, et al. 1986; Marinna, et al. 2004). En diversos estudios se ha encontrado una mutación en el gen RB en el cromosoma 13q en el 60-75% de los osteosarcomas y mutaciones en el gen p53 localizado en el cromosoma 17, en al menos 30-50% de los casos. (Berman, et al. 2008; Kim, et al. 2008)

Se ha propuesto que la edad de aparición del osteosarcoma, tiene que ver con el crecimiento rápido de los huesos. (Marinna, et al. 2004; Janes-Hedder 2002; Pierz et al. 2001; Berman, et al. 2008; Kim, et al. 2008)

Hay dos picos en donde es más probable la aparición de esta patología; el primero es, en la segunda década de la vida entre los 10 y 15 años (Lane, et al. 1986; Hoffer, et al. 2002) y el segundo en los adultos mayores de 60 años (Mejía y cols 2002); es casi dos veces más común en los hombres que en las mujeres (Lane, et al. 1986; Mejía y cols. 2002), en los hombres aparece en promedio uno o dos años de edad antes que las mujeres (Hoffer et al. 2002), y es más frecuente en la raza negra que en la blanca (Lane, et al. 1986).

Se ha descrito que la exposición a ciertos compuestos ambientales y a campos electromagnéticos pueden ser, una causa de las neoplasias en la población infantil (Hoffer, et al. 2002), se encuentra documentado que la exposición a radiaciones constituye un factor de riesgo para el osteosarcoma (Marinna, et al. 2004; Janes-Hedder 2002; Pierz, et al. 2001; Hoffer, et al. 2002).

La mayoría de los pacientes con osteosarcoma presentan síntomas y signos que incluyen: dolor, aumento de temperatura, inflamación de la región afectada y disminución de movilidad de las articulaciones (Marinna, et al. 2004; Mejía y cols. 2002), Es común que estos síntomas empiecen varios meses antes de que se haga el diagnóstico (Mejía y cols. 2002).

La extirpación completa del tumor es el objetivo principal en el manejo de los tumores óseos, sin embargo, uno de los grandes retos en ortopedia es ofrecer al paciente que su extremidad tendrá funcionalidad y por consiguiente, llevará una adecuada calidad de vida. En la década de los 70's surgieron los procedimientos de conservación de las extremidades de los pacientes con osteosarcoma, como

resultado del advenimiento de esquemas quimioterapéuticos más efectivos (Grimer, et al. 1999; Cara, et al. 1994; Enneking, et al. 1993), técnicas quirúrgicas nuevas (Malawer, et al. 1995; Kawai, et al. 1999) y la utilización de la ingeniería biomédica (Grimer, et al. 1999); por lo que actualmente en muchas instituciones de EU y Europa la conservación de las extremidades es el tratamiento estándar cuando hay tumores óseos (Grimer, et al. 1999; Malawer, et al. 1995; Ayoub, et al. 1999).

Diversas técnicas, se han utilizado con el objeto de restituir o regenerar el tejido óseo dañado, una de estas técnicas son los implantes o trasplantes, los cuales se dividen en: injertos autólogos, alogénicos, xenogénicos y dispositivos mecánicos. Pero ninguno de los tratamientos convencionales ha podido suplir todas las necesidades a la hora de tratar los problemas relacionados con la pérdida o deterioro del tejido óseo; por lo que, una de las soluciones alternas es la “ingeniería de tejidos” ó también conocida como medicina regenerativa. (Estrada y cols. 2006; Braddock, et al. 2001).

### ***INGENIERIA DE TEJIDOS O MEDICINA REGENERATIVA***

La ingeniería de tejidos (IT) se define según la National Science Foundation Workshop (NSFW) como un campo interdisciplinario de investigación con aplicaciones clínicas para restaurar, reemplazar o regenerar tejidos; y así tratar alguna función dañada, ya sea, por un defecto congénito, alguna enfermedad y/o trauma. Este método se utiliza en combinación de varios avances tecnológicos que van más allá de un trasplante tradicional y/o terapia (Langer-Vacanti 1993).

Además, en esta área, se aplican los principios y métodos de la ingeniería (materiales, química de superficie, química, física, matemáticas e ingeniería computacional) a los principios de las ciencias de la vida (como son biología molecular, biología celular, medicina de trasplantes, genética y cirugía), para comprender, la relación función-estructura de los tejidos normales, patológicos y al desarrollo de nuevos tejidos o constructos para aumentar, restaurar o mantener los sistemas biológicos existentes (Vacanti, et al. 1999).

Este nuevo campo, utiliza la combinación de células, biomateriales y factores de crecimiento para lograr la regeneración o reparación rápida de los tejidos con propiedades mecánicas y bioquímicas semejantes a las del tejido original.

En la actualidad, existe una enorme lista de tejidos que pueden fabricarse mediante la ingeniería de tejidos, como: hueso, hígado, músculo cardíaco, páncreas, piel, vejiga, uretra, tráquea, riñón, cartílago, y muy recientemente válvulas de corazón. Sin embargo, la producción de la mayoría de estos tejidos se realizan a nivel experimental en animales (Vacanti, et al. 1999; Estrada y cols. 2006; Langer-Vacanti 1993).

### ***ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN LA REGENERACIÓN ÓSEA***

Existen diferentes alternativas en la ingeniería de tejidos, en cuanto al tipo de células para implantar como tratamiento en la regeneración ósea, ya sea el uso actual de células obtenidas de tejido óseo autólogo (periostio principalmente) o el de células madre, también referidas como células troncales mesenquimales (CTM ó MSCs por sus siglas en inglés), las cuales por sus características se convierten en la primera elección para el tratamiento de diversas enfermedades (Vacanti, et al. 1999; Estrada y cols. 2006; Langer-Vacanti 1993; Laurencin, et al. 1996; Friedenstein, et al. 1969; Logeart, et al. 2005; Lakshmiopathy, et al. 2005).

### ***CELULAS MADRE***

Las células ideales para la ingeniería de tejidos deben ser fáciles de obtener y expandir, que conserven su fenotipo, función y multipotencialidad para diferenciarse o transdiferenciarse a una variedad de células especializadas específicas de tejidos u órganos y no deben generar respuestas inmunes. Lo anterior ha despertado un gran interés por las células madre, debido a que, se pueden replicar como células indiferenciadas sin perder su la capacidad de diferenciación a diferentes linajes (Laurencin, et al. 1996; Friedenstein, et al. 1969; Logeart, et al. 2005; Lakshmiopathy, et al. 2005).

Dos clases de células madre son las más estudiadas hasta el momento, las de origen embrionario (botón embrionario) y adulto (principalmente de médula ósea y tejido adiposo, entre otros) (Logeart, et al. 2005; Lakshmiathy, et al. 2005).

Las células madre embrionarias tienen el potencial de diferenciarse en cualquier tipo de tejido y de manera natural no son inmunogénicas, pero a pesar de las ventajas que presentan, su utilización se ve muy limitada por los problemas de tipo ético y metodológico que las rodean; además, no se conocen los mecanismos particulares para su diferenciación. Por otro lado, las células madre de individuos adultos han mostrado la capacidad de formar algunos tipos de tejidos y actualmente es la fuente celular más utilizada en la Ingeniería de tejido óseo, se localizan principalmente en la médula ósea (MO) (Munévar, et al. 2005; Lechner, et al. 2007).

La MO contiene al menos 2 tipos de células madre: las hematopoyéticas (CMH) y las mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSC) o también referidas como células troncales mesenquimales (CTM), estas células son de gran interés porque pueden fácilmente aislarse del aspirado de medula ósea y generan fácilmente colonias a partir de células individuales en cultivos *in vitro*. Estas colonias pueden ser expandidas alrededor de 50 veces su población celular, en 10 semanas y pueden diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos, condrocitos, miocitos, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Por estas razones, estas células son evaluadas por su potencial uso en la terapia genética y celular de algunas enfermedades. Trabajos previos demostraron que las colonias derivadas de células individuales de CTM son heterogéneas y presentan morfología diferente: células en forma de huso, células largas, cuboidales y aplanadas. También se ha demostrado que las colonias contienen células extremadamente pequeñas que se renuevan rápidamente por sí mismas (células RS). Las células RS parecen ser los primeros precursores en los cultivos y tienen un gran potencial para diferenciarse a múltiples linajes (Flores-Figueroa 2006; Colter et al. 2001; Gronthos et al. 2003; Simmons et al. 1991).

En este sentido, las CTM, muestran un fenotipo estable, permanecen en monocapa y se han utilizado con mayor frecuencia en la formación de tejido óseo,

tendón, cartílago y músculo. En la figura 1 se muestra los diferentes linajes que se generan a partir de las células troncales mesenquimales.

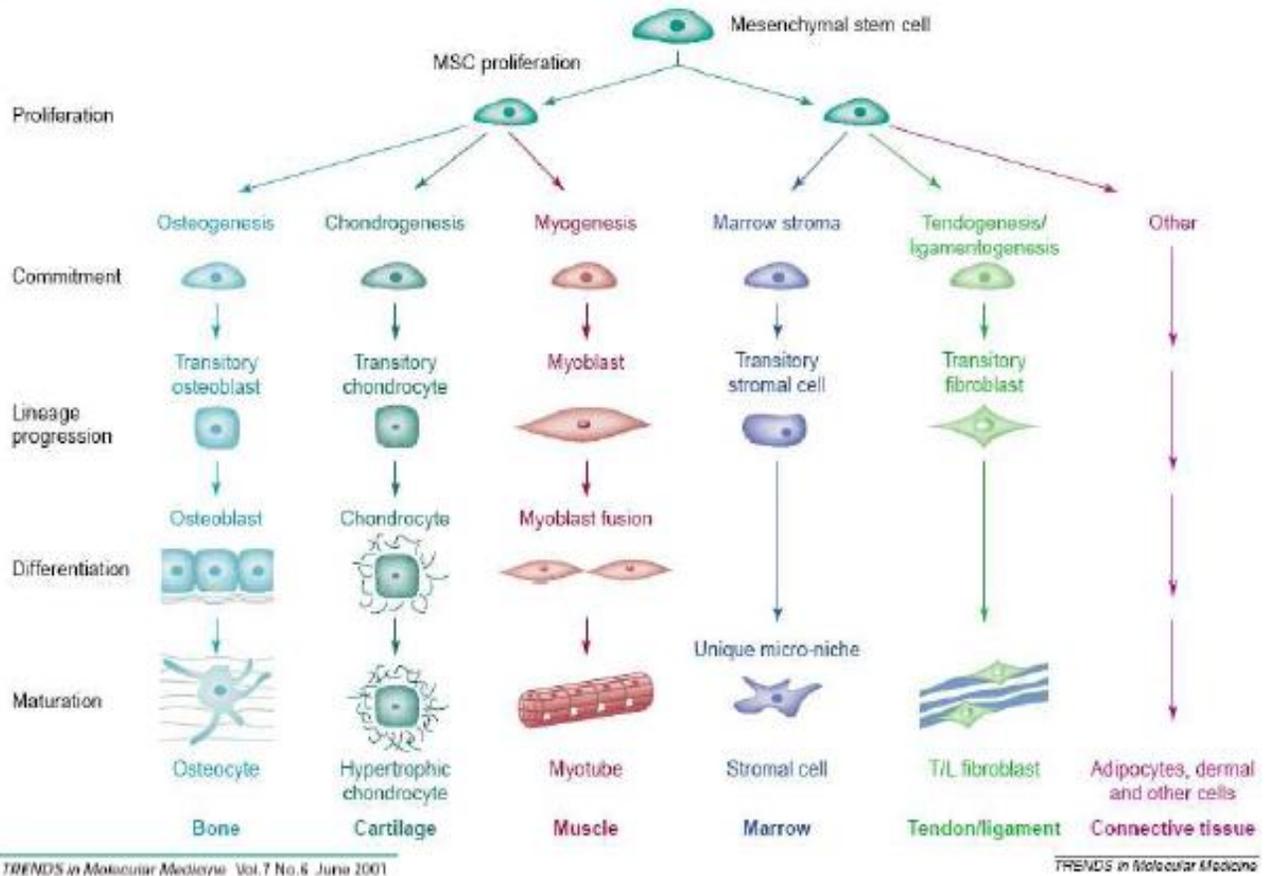


Figura 1. Diferenciación de las células troncales mesenquimales de medula ósea hacia diferentes tejidos. Se observa las diferentes etapas de diferenciación que adquiere este tipo celular para formar un tejido, por ejemplo, en el tejido óseo, en el cual, este tipo celular, primeramente se diferencia a osteoblastos y posteriormente a osteocito. Fotografía tomada de *TRENDS in Molecular Medicine* 2001: 7(6).

### ***CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (CTM).***

Fueron originalmente descritas por Friedenstein en 1966, estas células son capaces de auto replicarse y diferenciarse hacia una variedad de líneas celulares, sus principales características de viabilidad, multipotencialidad y la capacidad de auto-renovación, las convierte en la primera elección para el tratamiento de muchas enfermedades (Lakshmipathy, et al. 2005; Munévar, et al. 2005; Lechner, et al. 2007; Flores-Figueroa 2006).

Son multipotenciales, porque tienen la capacidad de dar origen a distintos tipos celulares dentro de un mismo tejido o capa embrionaria. Además, tienen la característica de plasticidad, ya que son capaces de diferenciarse en células maduras distintas a las de su origen.

Hay mucha discrepancia sobre estas células, por lo que, la ISCT (International Society for Cellular Therapy) ha definido a las CTM como una célula estromal mesenquimal multipotente, refiriéndose a las células tipo fibroblastoides de médula ósea, que se adhieren al plato de cultivo, capaces de diferenciarse a múltiples líneas de tejido conectivo. También ha establecido un criterio mínimo de seguimiento para definir a las CTM humanas: (1) Deben ser plástico-adherentes y tener una forma en huso (fibroblastoide) cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar; (2) Deben expresar las moléculas de superficie CD105, CD73, y CD90, y carecen de antígenos hematopoyéticos como: CD45, CD34, CD14, CD79 $\alpha$  y CD19; además la selección del medio de cultivo, puede tener un efecto sobre la expresión de ciertos marcadores. (3) Deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos *in vitro* (Flores-Figueroa 2006; Walker et al. 2009).

### ***OSTEOGENESIS***

Es un proceso complejo que involucra la diferenciación de células mesenquimales hacia pre-osteoblastos y osteoblastos, por acción de un medio de cultivo. Diversos autores, han utilizado la dexametasona para estimular los cultivos de médula ósea y así formar tejido óseo *in vitro*. Han caracterizado bioquímicamente a los osteoblastos por medio de la osteocalcina y la fosfatasa alcalina (Vega y cols. 2002; Handschel, et al. 2006; Sila, et al. 2007).

El medio de cultivo, que sirve para mantener a las células de médula ósea, es el  $\alpha$ -MEM, suplementado con antibiótico, agentes antimicóticos y 15% de suero fetal de bovino. Algunos autores también han usado al DMEM al 10% de SFB, como una fuente de nutrientes esenciales y aminoácidos (Chaudhary, et al. 2004; Panagiota et al. 2006).

Otros autores, han estudiado el efecto de añadir varios factores de crecimiento, ya sea solos o en combinación con el medio de cultivo, como el factor de crecimiento

epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ -1); los cuales han mostrado ser potentes mitogénos para la proliferación de estas células (Chaudhary, et al. 2004; Panagiota, et al. 2006; Ito, et al. 2008; Antosz, et al. 1989; Hernández, et al. 2006; Terheyden, et al. 2001; Marks, et al. 2001; Lieberman, et al. 2002).

Morfológicamente, la población celular estromal adherente en los cultivos de expansión parecen ser fibroblastos, también estos cultivos de medula ósea humana contienen células positivas a CD14 y CD40 (marcadores para macrófagos y células linfo-hematopoyéticas respectivamente), aproximadamente en un 5% de la población total. A un segundo pasaje estas células redondas han sido reducidas frecuentemente (1-2% del total celular).

Diversos medios de cultivo han sido utilizados para diferenciar a las células de medula ósea a osteoblastos y facilitar la formación de hueso *in vitro*. Uno de ellos es el medio estándar, que comprende  $\alpha$ -MEM, 15 % de SFB, antibiótico-antimicótico y suplementado con dexametasona (Dex  $10^{-8}$  M), ácido ascórbico (AA 50 $\mu$ g/mL) y  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP 10mM) (Kawazoe, et al. 2008; Chaudhary, et al. 2004).

### ***DEXAMETASONA.***

Es un glucocorticoide sintético que estimula la diferenciación celular de los progenitores osteogénicos. Esta concentración dependiente, estimula desde un rango de  $10^{-9}$  M a  $10^{-7}$  M y es requerida para la formación de tejido óseo *in vitro* (Zhou, et al. 2006;)

### ***$\beta$ -GLICEROFOSFATO ( $\beta$ -GP).***

Es añadido hacia el medio de cultivo como una fuente de fosfato orgánico, que facilita el proceso de mineralización de la matriz ósea. Mientras que la concentración de fosfato inorgánico del  $\alpha$ -MEM se encuentra en un rango fisiológico.

*In vivo*, varios fosfatos orgánicos actúan como sustratos para la enzima fosfatasa alcalina, la cual está asociada a la membrana celular y se ha visto que, el nivel de

expresión mayor de la fosfatasa alcalina se encuentra en los pre-osteoblastos (Panagiota, et al. 2006).

### ***ÁCIDO ASCÓRBICO (AA)***

Acelera la producción de matriz extracelular en forma de colágeno, que es otro de los factores principales durante el proceso de reparación (Hernández et al. 2006).

### ***MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y FORMACIÓN ÓSEA***

Estas son las proteínas sintetizadas por los osteoblastos (Molina y cols. 2003)

- Fosfatasa alcalina ósea (FA)
- Osteocalcina
- Colágeno tipo I

### ***FOSFATASA ALCALINA ÓSEA (FA)***

La fosfatasa alcalina, es una enzima abundante en los osteoblastos y se eleva durante la formación temprana de hueso, y los niveles elevados de FA se correlacionan con la diferenciación osteoblastica. (Cons M. 2003)

La FA se eleva en la infancia y adolescencia (debido al crecimiento), cuando hay fracturas óseas, en una enfermedad ósea maligna (primaria o metastásica), en el padecimiento de hiperparatiroidismo primario y secundario, en la enfermedad de Paget (Panagiota, et al. 2006).

### ***OSTEOCALCINA***

Es la proteína no-colágeno más abundante en la matriz ósea, regula la homeostasis del calcio, ya que inhibe la precipitación de fosfato y calcio, para evitar la mineralización excesiva de la matriz ósea, es producida por el osteoblasto, posterior a su síntesis, la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso. Su incremento refleja la actividad osteoblástica, y se asocia con la mineralización del hueso, aunque las concentraciones no son siempre paralelas a las de la fosfatasa alcalina ósea. (Cons M. 2003)

## ***COLÁGENO TIPO I***

Las fibras de colágeno representan alrededor de un 90% la matriz ósea y el componente principal es el colágeno de tipo-1. Aunque no se han establecido correlaciones definitivas entre fragmentos de pro-colágeno y formación ósea, debido a esto, no han alcanzado un suficiente desarrollo para ser actualmente una alternativa a la osteocalcina.

Por otro lado, el propéptido carboxiterminal de procolágeno tipo I (PICP) es una molécula precursora del colágeno tipo I. Su cuantificación da una idea de la velocidad de síntesis del colágeno tipo I.

## ***OTRAS PROTEÍNAS NO COLÁGENAS DE LA MATRIZ ÓSEA***

Algunas de ellas son glucoproteínas fosforiladas, que participan en la regulación y el mantenimiento del proceso de mineralización. Estas proteínas no-colágenos incluyen a la sialoproteína (BSP), la osteonectina y la osteopontina. La BSP es sintetizada por los osteoblastos y se deposita en el tejido osteoide nuevo. Se ha sugerido que está involucrada en la regulación del remodelado óseo. La osteopontina y la osteonectina pueden ser sintetizadas por los osteoblastos, pero también están presentes en otros tejidos conectivos. La osteopontina se fija a la hidroxiapatita y a las células, participa durante la resorción osteoclástica vía mediación de la fijación de los osteoclastos a la superficie de la fase mineral.

Por otro lado, la diferenciación de las CTM a diferentes linajes, se ve afectada por diferentes factores de crecimiento que promueven el cambio de fenotipo (Becerra et al. 2001; Lechner V. 2007; Lieberman, et al. 2002).

Por lo que, las células osteoblasticas, los factores de crecimiento y la matriz extracelular, son los actores de la obra osteogénica, pero todos ellos, están en un proceso integrado y orquestado en el organismo bajo múltiples influjos hormonales (Lieberman, et al. 2002).

## ***FACTORES DE CRECIMIENTO (FCs)***

El conocimiento sobre el desarrollo embrionario del hueso ha llevado al descubrimiento de los factores que regulan la diferenciación y la proliferación celular. Por otro lado, los resultados obtenidos de estudios experimentales han establecido que los FCs juegan un papel importante en la formación de hueso y cartílago, en la recuperación de fracturas y reparación de otros tejidos musculoesqueléticos. Recientemente con el descubrimiento de proteínas recombinantes, ha sido de gran interés el uso de los FCs como agentes terapéuticos en el tratamiento del daño esquelético (Lieberman, et al. 2002).

En general los FCs, puede ser polipéptidos, glicoproteínas y otras moléculas relacionadas, que son producidos en cantidades muy limitadas, que estimulan o inhiben la proliferación, la diferenciación y las funciones especializadas de casi cualquier tipo de célula (Maldonado y cols. 1996).

Los FCs pueden actuar sobre: 1) la misma célula que lo produce, por vía autocrina; 2) en células vecinas, por vía paracrina y/o 3) en un grupo celular distante, por vía endocrina (Ganong y cols. 1994; Alberts, et al. 2002).

Los FCs son sintetizados en el retículo endoplásmico en forma de grandes moléculas precursoras: pre-pro-factores o pro-factores; luego se almacenan en forma de gránulos en el aparato de golgi; allí se realiza el procesamiento de los pre-pro-factores y de los pro-factores en factores y finalmente, los gránulos son vertidos al líquido extracelular mediante exocitosis (Vega y cols. 2002).

Al ingresar al líquido extracelular ya sea intersticial o plasmático los FCs se fijan rápidamente, a proteínas que impiden su degradación y que se denominan: Proteínas Transportadoras o de Unión (Binding Proteins o BP). Al igual que las hormonas, los FCs sólo ejercen efectos fisiológicos cuando no están unidos a las BP y en consecuencia, pueden unirse fácilmente a los receptores de las células blanco (Vega y cols. 2002).

## **MECANISMO DE ACCIÓN**

Al igual que otros mensajeros químicos, los FCs ejercen sus efectos, inicialmente, mediante la unión a receptores específicos ubicados en la membrana celular.

Por lo general, estos receptores son enzimas que catalizan la fosforilación de las proteínas en tirosina, por lo que se las denomina tirosina-cinasas (TK); o hay otros tipos de receptores que también son cinasas que fosforilan en residuos de serina y treonina. Las TK inician reacciones en cascada, que además son ramificadas. Por lo general, la unión entre receptor y ligando lleva a la autofosforilación y activación de la enzima receptora. El receptor activado se une a proteínas citoplasmáticas que inician una cascada, que culmina con la fosforilación de proteínas, que a su vez fosforilan factores de transcripción cuya activación determina que se modifique la expresión de ciertos genes, y produzcan una respuesta celular trófica (proliferación y diferenciación celular) o metabólica (función celular especializada), última etapa de la serie de reacciones (Vega y cols. 2002; Barbeito y cols. 2005). Los factores de transcripción (FT), son unas proteínas intracelulares que se activan como parte de las vías de señalización iniciadas por la unión intracelular de un receptor. Los FT activados, viajan hacia el núcleo, se enlazan hacia el DNA nuclear e inducen la expresión de un nuevo gen o conjunto de genes. La expresión de estos nuevos genes cambia las características de la célula. Esta secuencia de eventos, es similar a aquellos que ocurren con otros agentes tales como hormonas esteroides, las cuales se enlazan a receptores intracelulares e inducen diferentes tipos de vías de señalización intranucleares.

### ***FUNCIONES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LAS CELULAS OSTEOPROGENITORAS.***

Los FCs más relacionados con la osteogénesis son: las proteínas morfogénicas óseas (*bone morphogenetic protein* BMP), el factor de crecimiento semejante a la insulina (*insulin-like growth factor* IGF), el factor transformante del crecimiento de tipo beta (*transforming growth factor beta* TGF $\beta$ ), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor* PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (*fibroblast growth factor* FGF $\beta$ ) (Barbeito y cols. 2005; Schilephake, H 2002; Handschel, et al. 2006; Kim, et al. 2007).

A continuación se describen las principales familias de factores de crecimiento que intervienen en la reparación ósea.

### ***FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGF)***

El sistema del IGF comprende los factores de crecimiento IGF-I, IGF-II y la propia insulina, sus receptores y una serie de proteínas denominadas IGFBPs, que regulan la disponibilidad de los mismos.

La mayoría de estos FCs son sintetizados por el megacariocito, pero el IGF-I y la proteína que modula su actividad biológica, IGFBP-3 (insulin growth factor binding protein -3) se sintetizan en el hígado y se liberan al torrente sanguíneo, y las plaquetas son las encargadas de captar el factor por endocitosis y almacenarlo en los gránulos alfa. Se unen a receptores específicos para IGF1R (tirosin-cinasa) e IGF2R (manosa 6- fosfato).

El IGF está activamente involucrado en el desarrollo esquelético, su papel en la reparación y remodelación del esqueleto adulto se ha convertido en un tema de interés. Aunque el IGF-2 es el factor de crecimiento más abundante en el hueso, el IGF-I se ha visto que es el más potente y se ha localizado en la recuperación de fracturas en ratas y humanos; además, promueve la formación de hueso por estimulación de la proliferación y diferenciación de osteoblastos (Lieberman, et al. 2002; Nakayama, et al. 2006).

### ***FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF)***

Son una familia de polipéptidos, de los cuales los mejor caracterizados son el FGF-1 o FGFa (ácido) y el FGF-2 o FGFb (básico) (Barbeito y cols. 2005; Arrieta y cols. 2005; Bosque 2001; Ornitz y cols. 2001). El FGF es un polipéptido mitógeno aislado de cerebro y pituitaria, el cual se ha demostrado que es mitógeno para las células derivadas del mesodermo en cultivo de tejidos. Sus efectos biológicos se regulan mediante los receptores de superficie con alta afinidad. Desarrollan su actividad a partir de la tirosina-cinasa (Barbeito y cols. 2005).

El FGFa y el FGFb promueven la proliferación y diferenciación de una variedad de células, incluyendo células epiteliales, miocitos, osteoblastos y condrocitos. Los efectos mitogénicos del FGFa han sido asociados con la proliferación de condrocitos, mientras que el FGFb es un potente mitógeno y factor de diferenciación para los osteoblastos, tanto *in vitro* como *in vivo*, además es más potente que el FGFa. Ambos han sido identificados durante etapas tempranas de

la recuperación de fracturas (Lieberman, et al. 2002; Ito, et al. 2008; Kawazoe, et al. 2008; Chaudhary, et al. 2004; Panagiota, et al. 2006).

### ***FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)***

El EGF estimula la proliferación de las células epidérmicas y de una gran variedad de otros tipos celulares, tanto epiteliales como no epiteliales (Maldonado y cols. 1996; Vega y cols. 2002; Arrieta y cols. 2005).

*In vitro*, actúa como mitógeno para fibroblastos, células mesenquimales, condrocitos y células endoteliales. *In vivo*, induce el desarrollo epitelial y promueve la angiogénesis. También tiene un efecto en cultivos de osteoblastos y sobre los constituyentes de la matriz extracelular, puede favorecer o inhibir la síntesis de proteoglicanos (Antosz, et al. 1989; Hernández, et al. 2006).

### ***FAMILIA DE LAS PROTEINAS MORFOGENICAS DE HUESO (BMP)***

Son citocinas, las cuales son miembros de la súper familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Actualmente, se conoce que la BMP-2, 4 y 7 juegan un importante papel en la recuperación ósea, por medio de su capacidad para estimular la diferenciación de células mesenquimales hacia una línea osteocondroblastica. La BMP-2, 4 y 7 se unen a receptores específicos para el complejo serina/treonina-cinasa para iniciar la señalización celular. Recientemente la BMP-7 han recibido la aprobación de la FDA (food and drug administration USA) para el tratamiento de las uniones de tibia (Kang et al. 2007). La BMP-7 es también conocida como la proteína osteogénica-1 (rhOP-1), la cual es osteoconductiva (Terheyden, et al. 2001), y ha sido evaluada en diversos procedimientos de recuperación sobre defectos óseos. Además este agente osteogénico es capaz de regular la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso *in vitro* (Lieberman, et al. 2002; Chaudhary, et al. 2004).

### ***PROSTAGLANDINA E -1 (PE-1)***

Las prostaglandinas (PGs) son uno de los más importantes factores locales con un papel paracrino/autocrino en el hueso. Se ha reportado que el tejido esquelético produce PGs y su producción está controlada por diversas hormonas como la vitamina D<sub>3</sub>, calcitonina, glucocorticoides, glándula tiroides y esteroides sexuales.

Las PG son producidas en respuesta a la inflamación, lesión y estrés mecánico y se han visto implicadas en la regulación local del metabolismo óseo. Varias evidencias indican que las prostaglandinas estimulan la formación de hueso *in vivo*. Principalmente se conoce que la prostaglandina E-1 (PE-1 ó PGE-1) y la prostaglandina E-2 (PE-2 ó PGE-2) tienen efectos en el tejido óseo.

La infusión de PE-1 en infantes con lesión cianótica de corazón produce nueva formación de hueso periosteal (Ueda, et al. 1997) y la administración sistémica y local de PE-1 y PE-2 incrementa la formación de hueso trabecular y periosteal en perros y ratas (Marks, et al. 2001; Harada, et al. 2007). Aunque se ha demostrado que la PE-1 y PE-2 estimula la proliferación de osteoblastos en órganos y cultivos celulares, el mecanismo de la estimulación de PG en la formación de hueso todavía no es claro. Solamente se sabe que se unen a receptores específicos, como el EP<sub>4</sub> (Harada, et al. 2007).

## II. JUSTIFICACIÓN

---

Diversas técnicas, se han utilizado con el objeto de restituir o regenerar el tejido óseo dañado a causa de los tumores y otras patologías, una de estas técnicas son los implantes o trasplantes, pero tiene los siguientes inconvenientes: 1) es un método costoso, 2) es deficiente por la falta de donadores, 3) se requieren medicamentos para evitar el rechazo inmune, y 4) la vida media de un órgano trasplantado es de 8 años; por lo que muchos países, han invertido dinero en la búsqueda de nuevos métodos que sustituyan o mejoren los trasplantes de órganos, surgiendo así la ingeniería de tejidos (IT), con la cual, se pueden fabricar diferentes tejidos autólogos *in vitro*, que evitan el rechazo del órgano trasplantado. Desafortunadamente, la mayoría de estos tejidos son proyectos que solo se realizan a nivel experimental en animales.

Una de las células de gran interés para la ingeniería de tejidos, en la formación de tejido óseo, son las células troncales mesenquimales (CTM), porque, pueden fácilmente aislarse del aspirado de medula ósea, diferenciarse hacia osteoblastos, y estas a su vez, sintetizar proteínas de matriz extracelular para formar un tejido óseo.

Hasta el momento, se han estudiado diferentes sustancias que estimulan la diferenciación de CTM a osteoblastos como son: dexametasona, vitamina D3,  $\beta$ -glicerofosfato y ácido ascórbico. Además, se ha comprobado experimentalmente que algunos factores de crecimiento son expresados durante la curación de fracturas óseas y varios de estos factores de crecimiento tienen efectos sobre la proliferación y actividad de los osteoblastos y células estromales de medula ósea, dentro de los cuales se incluyen: el BMP-7, IGF-1, EGF, FGFb y PE-1.

Además, la formación de hueso puede variar dependiendo de los cultivos primarios, obtenidos de la medula ósea y principalmente, de las condiciones de cultivo. Por lo que, para ser consideradas las CTMMO en la terapia clínica, el sistema de las CTMMO necesita ser altamente estandarizado y eficazmente reproducible en la formación de hueso.

Por lo anterior, el siguiente trabajo intenta aportar las condiciones óptimas de cultivo para la proliferación y diferenciación de las CTMMO a osteoblastos obtenidos de pacientes con osteosarcoma y así mejorar la calidad de los osteoblastos y expresión o síntesis de proteínas de matriz extracelular, en un menor tiempo, lo que conlleva a una adecuada reconstitución del tejido óseo.

### III. HIPOTESIS

---

Si obtenemos las células troncales mesenquimales de la medula ósea de pacientes con osteosarcoma, y las diferenciamos *in vitro*, hacia osteoblastos con: medio osteogénico ( $\alpha$ -MEM, dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato y 15% de SFB), medio diferenciador y medio osteogénico más FGFb, EGF, IGF-I, BMP-7 y PE-1; entonces, favoreceremos la diferenciación, proliferación y síntesis y/o expresión de las proteínas de matriz extracelular, y al realizar una comparación morfológica y bioquímica, obtendremos la mejor condición de cultivo, para generar osteoblastos a partir de CTMMO.

## IV. OBJETIVO GENERAL

---

Analizar y comparar el efecto en la proliferación y diferenciación celular de tres condiciones de cultivo en células troncales mesenquimales de médula ósea provenientes de pacientes con osteosarcoma.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Obtener y caracterizar a las células troncales mesenquimales de medula ósea de pacientes con osteosarcoma, mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo.
- B. Evaluar la multipotencialidad de las células troncales mesenquimales de medula ósea mediante la diferenciación hacia adipocitos con la tinción con rojo oleoso.
- C. Diferenciar *in vitro* las células troncales mesenquimales de médula ósea hacia osteoblastos a 5, 12 y 20 días de cultivo, utilizando tres condiciones de cultivo diferentes
- D. Evaluar la proliferación celular *in vitro* de las células troncales mesenquimales de médula ósea y de las diferenciadas hacia osteoblastos a 5, 12 y 20 días de cultivo.
- E. Evaluar la actividad de fosfatasa alcalina *in vitro* de las células troncales mesenquimales de médula ósea diferenciadas hacia osteoblastos a 5, 12 y 20 días de cultivo.
- F. Caracterizar las células troncales mesenquimales de médula ósea diferenciadas hacia osteoblastos mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo a los 12 días de cultivo *in vitro*.

# V. MATERIAL Y METODOS

---

## ***AISLAMIENTO DE LAS CELULAS TRONCALES MESENQUIMALES.***

El aspirado de medula ósea de pacientes pediátricos con osteosarcoma, se transportó al laboratorio en un tubo falcón de 50 mL estéril con heparina. En condiciones de esterilidad, se le agregó 10 mL de solución Hank's 1X (10X GIBCO) y de este aspirado se separó, a las células mononucleares mediante un gradiente de NycoPrep™ 1.077 g/mL. Posteriormente se centrifugó por 30 minutos a 1500 rpm (SORVALL). Las células mononucleares obtenidas de la interface PBS-NycoPrep, fueron lavadas en dos ocasiones con solución Hank's 1X y centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm, finalmente fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (CORNING). A cada pozo se le agregó 3 mL de medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB), antibiótico-antimicótico 1% (GIBCO) y se cultivaron en una incubadora (REVCO) a 37°C, humedad saturada y 5% de CO<sub>2</sub>. A las 72 horas se realizó un lavado con la solución de Hank's 1X para eliminar las células no adherentes y se adiciono medio fresco. Una vez que los cultivos alcanzaron una confluencia celular del 80%, se procedió a resembrarlos. Para estas resiembras, se utilizó una solución de tripsina-EDTA (0.025%, GIBCO), la cual, se incubó por 10 min a 37°C y las células fueron despegadas del sustrato. Posteriormente las células fueron lavadas en dos ocasiones con PBS estéril y se sembraron a una concentración de  $2 \times 10^3$  cel/mL en cajas petri de 100 mm x 20mm (CORNING) con 10mL de DMEM adicionado con 10% de SFB. Estas células se resembraron hasta un tercer pase para su evaluación y posteriormente su diferenciación celular hacia osteoblastos.

## ***MULTIPOTENCIALIDAD CELULAR .***

Para comprobar su multipotencialidad de las CTMMO, se diferenciaron hacia adipocitos, mediante un medio adipogénico ( $\alpha$ -MEM, dexametasona (DEXA)  $10^6$  M, isobutilmethylxanthine (IBMX) 0.5 mM, e insulina 10  $\mu$ g/mL) por 15 días en placas de cultivo de 6 pozos, transcurrido ese tiempo se fijaron con una solución de formaldehído al 10% y se caracterizaron mediante la tinción con rojo oleoso.

## ***CARACTERIZACIÓN CELULAR DE LAS CTMMO.***

### ***-POR INMUNOHISTOQUIMICA***

La caracterización celular se realizó utilizando el kit En vision+® System-HRP (DAB) (DakoCytomation), y los siguientes anticuerpos: Anti-Stro-1 (monoclonal, CHEMICON) dilución 1:25; Anti-CD105/Endoglin (monoclonal, R&D), dilución 1:5000 y Anti-CD14 (monoclonal, CHEMICON) dilución 1:100.

Las CTMMO de pacientes con osteosarcoma, se evaluaron al tercer pase. Esta evaluación se determinó de la siguiente manera: las CTMMO se sembraron en placas Lab-Tek de 8 pozos (Nalge Nunc Int), a una concentración de  $20 \times 10^3$  células por pozo y se mantuvieron en medio DMEM adicionado con 10% de SFB a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Posteriormente, las células fueron fijadas con acetona fría (-20°C) (SIGMA) por 1 min, se lavaron con PBS/tween 20 y se bloquearon con la solución de peroxidasa endógena por 10 min, después las células se lavaron con agua destilada y se volvieron a incubar por 10 minutos con el bloqueador universal 1X (Biogener 10X). Transcurrido el tiempo se decantó la solución de cada pozo y se incubaron con los anticuerpos monoclonales arriba mencionados por 24 hrs, los cuales fueron disueltos en PBS/tween 20. Posteriormente se lavó en dos ocasiones cada pozo con PBS/tween 20 (0.01%), y se incubaron con el polímero del kit (labelled polymer-hrp anti-mouse), durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron 2 veces con PBS/tween 20 y se agregó el cromógeno (DAB) por 1 min, después se lavó en tres ocasiones cada pozo. Finalmente, las preparaciones se tiñeron con hematoxilina por 1.5 min, se montó en resina sintética para observarse y evaluarse en el microscopio de luz visible.

### ***-POR CITOMETRIA DE FLUJO (FACS).***

Las células fueron despegadas del sustrato utilizando tripsina-EDTA (0.025%) y fueron lavadas en dos ocasiones con PBS estéril y frío. Posteriormente, se colocaron  $2 \times 10^5$  células en viales y fueron incubadas con 100 µL de PBS-albúmina sérica bovina al 0.01% (SIGMA) por 15 min.; transcurrido este tiempo se lavaron 2 veces con PBS frío y posteriormente se incubaron en 100 µL con los anticuerpos

arriba mencionados, uno en cada vial por 45 min a 4°C. Posteriormente, se lavaron en dos ocasiones con PBS y se centrifugaron. El botón celular obtenido de cada vial, se re-suspendió y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC (SIGMA) dilución 1:200 por 30 min. Dos viales se utilizaron como blancos, uno con células marcadas con FITC y otras sin marcaje. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron en dos ocasiones y se centrifugaron. Cada botón celular fue re-suspendido en 1 mL de PBS y se procedió a leerlos en un FACS-Scalibur en el canal 2, a una longitud de onda de 520 nm.

### ***DIFERENCIACIÓN OSTEOLÁSTICA.***

Al tercer pase, las células troncales mesenquimales de médula ósea de pacientes con osteosarcoma, se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos y se procedió a diferenciarlas bajo tres condiciones de cultivo: **1)** con 3 mL de medio osteogénico compuesto de  $\alpha$ -MEM (ácido ascórbico, y vitamina D<sub>3</sub>), dexametasona 10 nM,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM y se adiciono con 15% de SFB; **2)** con 3 mL de medio diferenciador, el cual es un medio comercial (NH OsteoDiff Médium, Miltenyi Biotec) y sirvió como control positivo; y **3)** con 3 mL de medio osteogénico suplementado con los siguientes factores de crecimiento (uno en cada pozo): BMP-7 (40 ng/mL. R&D), PE-1 (35 ng/mL. R&D), FGF-2 (5 ng/mL. SIGMA), EGF (10 ng/mL. SIGMA), IGF-I (50 ng/mL. BIOSOURCE). Además se cultivaron estas células por separado con DMEM adicionado con 10% SFB para que sirviera como blanco (control negativo); este experimento se mantuvo en cultivo por 5, 12 y 20 días, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y un ambiente humificado.

### ***CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO DE MTT.***

En placas de 24 pozos fondo plano (COSTAR) se sembraron las CTMMO a una concentración de  $5 \times 10^3$  células/mL y se cultivaron con medio DMEM con 10% de SFB, y mediante las tres condiciones de cultivo descritas con anterioridad para su diferenciación celular. Se evaluaron con el MTT (SIGMA) a diferentes días: 5, 12, y 20 días por triplicado. El MTT es un colorante amarillo soluble en agua, el cual es

reducido por las células vivas a formazan, un colorante púrpura e insoluble en agua.

La evaluación se hizo de la siguiente manera: a tres pozos de cada una de las condición de cultivo, se les adicionó 40  $\mu$ L de la solución de MTT-PBS (5mg/mL) y fueron incubadas de 3-4 horas a 37°C; trascurrido el tiempo, se retiró el medio-solución de MTT-PBS, entonces los pozos se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X y se les agregó 100  $\mu$ L de alcohol isoamílico-HCl (0.04%) (SIGMA), se resuspendió bien el precipitado azul (hasta que se disolvió) y se tomó una alícuota de 30  $\mu$ L para ser leídos en un lector de placas para ELISA (Tecan GENios) a 595 nm.

### ***EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA.***

Para esta evaluación se utilizó el p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System (SIGMA).

En placas de 24 pozos fondo plano, se sembraron las CTMMO a una concentración de  $5 \times 10^3$  células/mL y se cultivaron en medio DMEM adicionado con 10% de SFB y mediante las tres condiciones de cultivo descritas con anterioridad para su diferenciación. Se incubaron a los días: 5, 12 y 20 días por triplicado. Posteriormente se evaluó la actividad de fosfatasa alcalina a cada muestra durante estos días.

Brevemente, el medio de cultivo de cada pozo a evaluar, fue removido, y la capa celular fue lavada 2 veces con PBS 1X y lisada con 20  $\mu$ L del buffer de lisis que contiene tritón X-100 al 0.1% (SIGMA). El lisado celular (20  $\mu$ L) se mezcló con 100  $\mu$ L del buffer Tris-glicina pH 10.3 (50 mM Tris-HCl, 100 mM glicina, y 2 mM  $MgCl_2$ ) y 100  $\mu$ L del p-nitrophenyl phosphate (SIGMA). La mezcla de reacción fue incubada en placas de 96 pozos de fondo plano, transparentes por 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción añadiendo 50  $\mu$ L de NaOH 3 M y finalmente fueron leídas a 405 nm en un lector de placas Tecan GENios.

## ***CARACTERIZACIÓN CELULAR DE LOS OSTEOLASTOS.***

### ***-POR INMUNOHISTOQUIMICA***

La caracterización celular se realizó al día 12, utilizando el kit En vision+® System-HRP (DAB) (DakoCytomation), y los siguientes anticuerpos: Anti-Osteopondina (monoclonal, R&D), dilución: 1:50 (10µg/mL); Anti-Osteocalcina (monoclonal, R&D), dilución: 1:50 (10 µg/mL); Anti-RUNX2/CBFA1 (monoclonal, R&D), dilución: 1:50 (10 µg/mL); Anti-colágeno tipo I (monoclonal, MILLIPORE), dilución: 1:100, Anti-fosfatasa alcalina (monoclonal, R&D), dilución: 1:50 (10 µg/mL). Los anticuerpos fueron diluidos con PBS/tritón 0.01%, excepto para el anti-colágeno tipo 1, el cual fue diluido en PBS/tween 20.

Antes de su evaluación las células troncales mesenquimales se diferenciaron durante 11 días hacia osteoblastos, mediante las tres condiciones de cultivo mencionadas. Posteriormente, estas células se sembraron en placas de cultivo Lab-Tek de 8 pozos a una concentración de  $20 \times 10^3$  células por pozo y se cultivaron nuevamente bajo las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente por 24 horas. Además otros pozos se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% SFB, los cuales se utilizaron como blanco de reactivos. Trascurrido el tiempo, las células fueron fijadas con acetona fría (-20°C) por 1 min y caracterizados por los anticuerpos mencionados, mediante la técnica descrita para inmunohistoquímica, excepto para el anti-RUNX2/CBFA1 el cual era anti-rata; por lo que, se incubó con el Multilink 1:50 (DakoCytomation) por 45 min. como anticuerpo secundario; se lavo 2 veces con PBS/tritón 0.01% y se incubó con Streptavidina 1:100 (DakoCytomation) como anticuerpo terciario por 45 min. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento que los demás anticuerpos.

### ***POR CITOMETRIA DE FLUJO (FACS).***

Para la caracterización por FACS, las células fueron diferenciadas por 12 días mediante las tres condiciones de cultivo descritas, y fueron caracterizadas por los anticuerpos anti-osteocalcina y fosfatasa alcalina a una dilución: 1:50, usando el mismo método para citometria de flujo descrito con anterioridad.

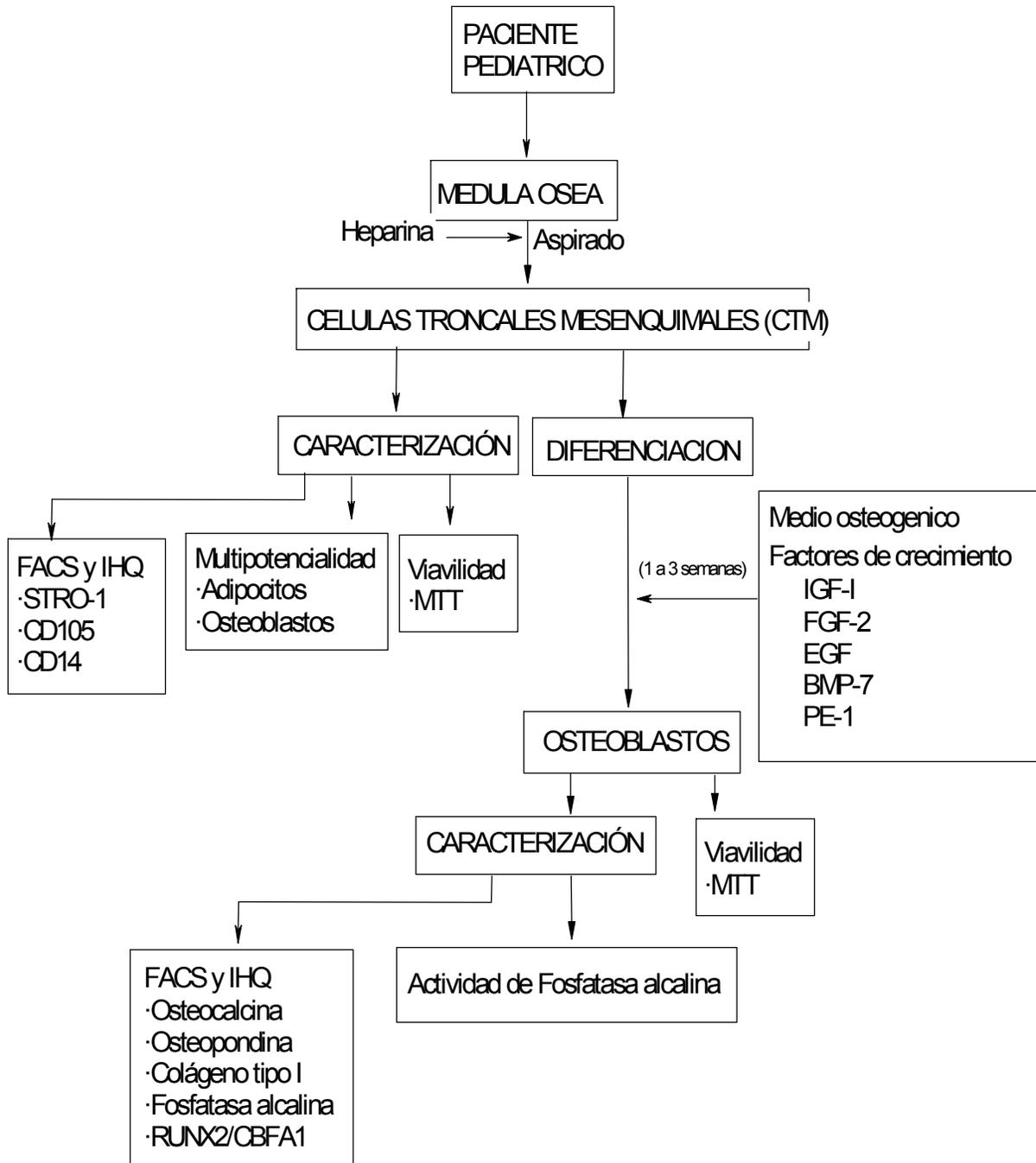
# ANALISIS ESTADISTICO

---

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba de t-student, para determinar, si el resultado obtenido tiene una diferencia significativa. El valor se acepto, cuando se obtuvo una  $p < 0.05$ .

Para determinar esta prueba estadística se utilizó el programa SPSS 15.0 para Windows.

# DIAGRAMA DE FLUJO



## VI. RESULTADOS

---

### ***OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE LA MEDULA ÓSEA.***

La fracción mononuclear del aspirado de medula ósea de pacientes con osteosarcoma se obtuvo por un gradiente de densidad y a partir de esta fracción, se seleccionó las células adherentes al plato de cultivo, lo cual permitió eliminar las células del linaje hematopoyético que se encontraban en suspensión. Las células mononucleares adherentes presentaron principalmente una morfología fibroblastoide o en forma de huso y el núcleo alargado con cromatina homogénea (figura 2).

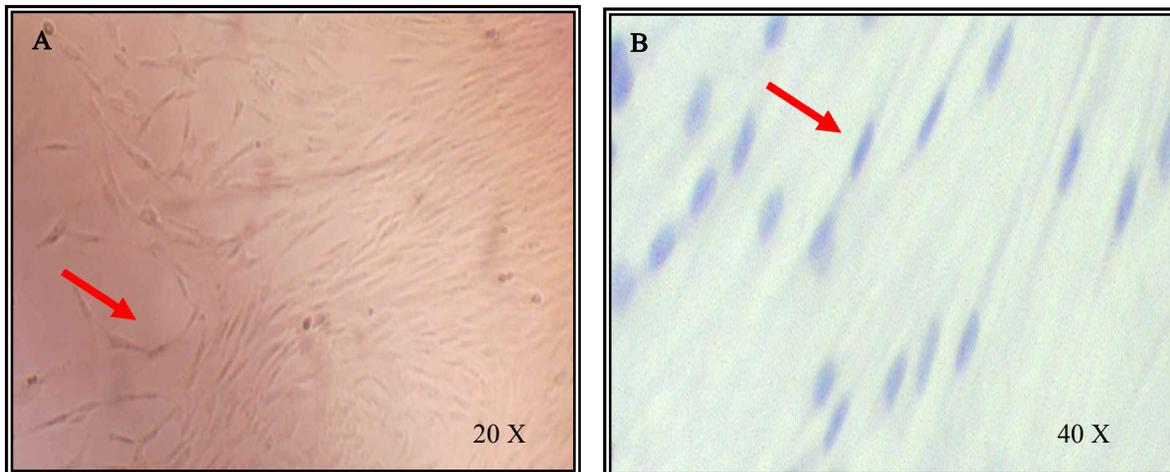


Figura 2. Morfología de las células mononucleares adherentes de MO. (A) Cultivo en monocapa *in vitro* durante el 3 pase de cultivo, donde se observa la apariencia fibroblástica ó en forma de huso (ver flecha) y (B) Cultivo fijado y teñido con hematoxilina, en el cual se observa un núcleo alargado con cromatina homogénea 40X.

## **MULTIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA .**

Para comprobar que las células provenientes de MO adheridas a los platos de cultivo y con morfología fibroblastoide son células troncales mesenquimales, se evaluó su multipotencialidad, mediante la diferenciación hacia adipocitos. Después de 2 semanas de cultivo, en presencia de medio adipogénico, las células de MO se diferenciaron a adipocitos, y se observó que gradualmente cambio su morfología fibroblástica, el núcleo se hizo más grande y se formaron gotas de grasa. Esta diferenciación, se caracterizó mediante la tinción con rojo oleoso (un colorante específico para tejido adiposo). Los resultados muestran alrededor de un 30% de positividad a esta tinción (figura 3b y c), sin embargo, las células de MO cultivadas en medio  $\alpha$ -MEM más SFB al 2.5% no hay positividad (figura 3a).

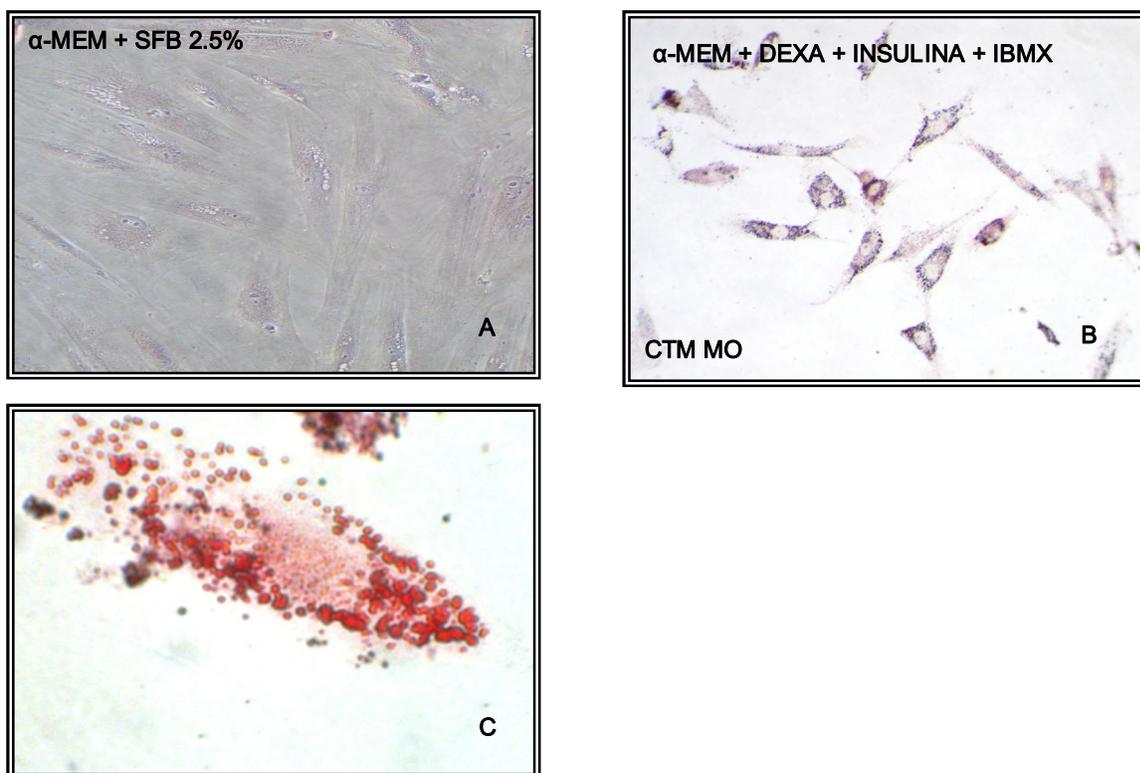


Figura 3. Diferenciación de las células de MO hacia adipocitos. **(A)** Control negativo, células de MO cultivadas en medio  $\alpha$ -MEM más SFB y teñidas con rojo oleoso (20X). **(B)** Células de MO cultivadas con medio adipogénico y diferenciadas hacia adipocitos por la tinción positiva con rojo oleoso, se pierde la morfología fibroblástica, el núcleo es más grande y se observa la formación de gotas de grasa (20X). **(C)** se observa a mayor aumento la formación de gotas de lípidos (teñidas con el rojo oleoso) (40X).

### ***CARACTERIZACIÓN DE LAS CTMMO.***

Por inmunohistoquímica, se observó que las células provenientes de la médula ósea de pacientes con osteosarcoma, son positivas para STRO-1 (figura 4B) y CD105 (figura 4C). Además son negativas para CD14 (figura 4D). Por lo cual, se demuestra que las células obtenidas de la MO de pacientes con osteosarcoma son adherentes, de morfología fibroblastoide, multipotenciales, positivas a STRO-1 y CD105, además negativas a CD14, en conclusión son células troncales mesenquimales (figura 4).

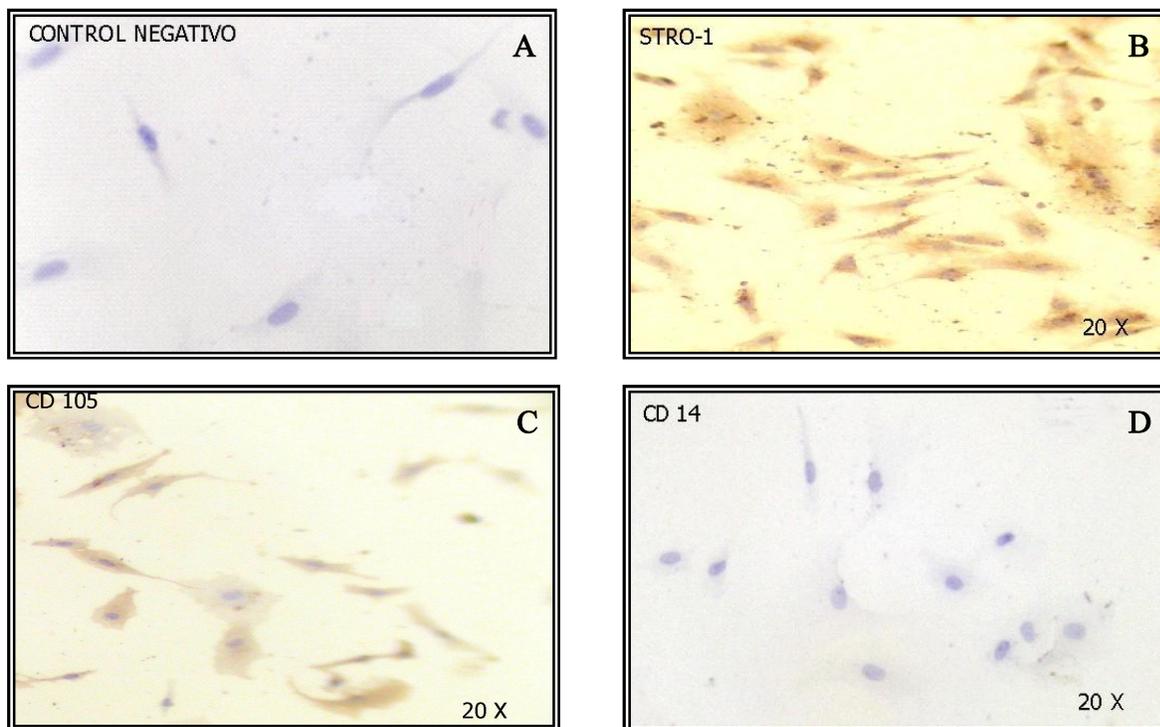


Figura 4. Caracterización por inmunohistoquímica de las células CTMMO. **(A)** Control negativo, células en ausencia de anticuerpo 1<sup>ro</sup>. Donde se demuestra que no hay inespecificidad por el marcaje con el cromógeno. **(B)** células de MO con morfología fibroblástica, en forma de huso y estrelladas, son positivas a STRO-1. **(C)** también son positivas a CD-105. **(D)** y negativas a un marcador de linaje hematopoyético como el CD14.

Estos resultados fueron confirmados y cuantificados por citometría de flujo. Los resultados muestran que alrededor del 15% de la población celular son positivas a STRO-1 y un 20% a CD105; mientras que las células positivas a CD14 representan sólo el 1% (figura 5).

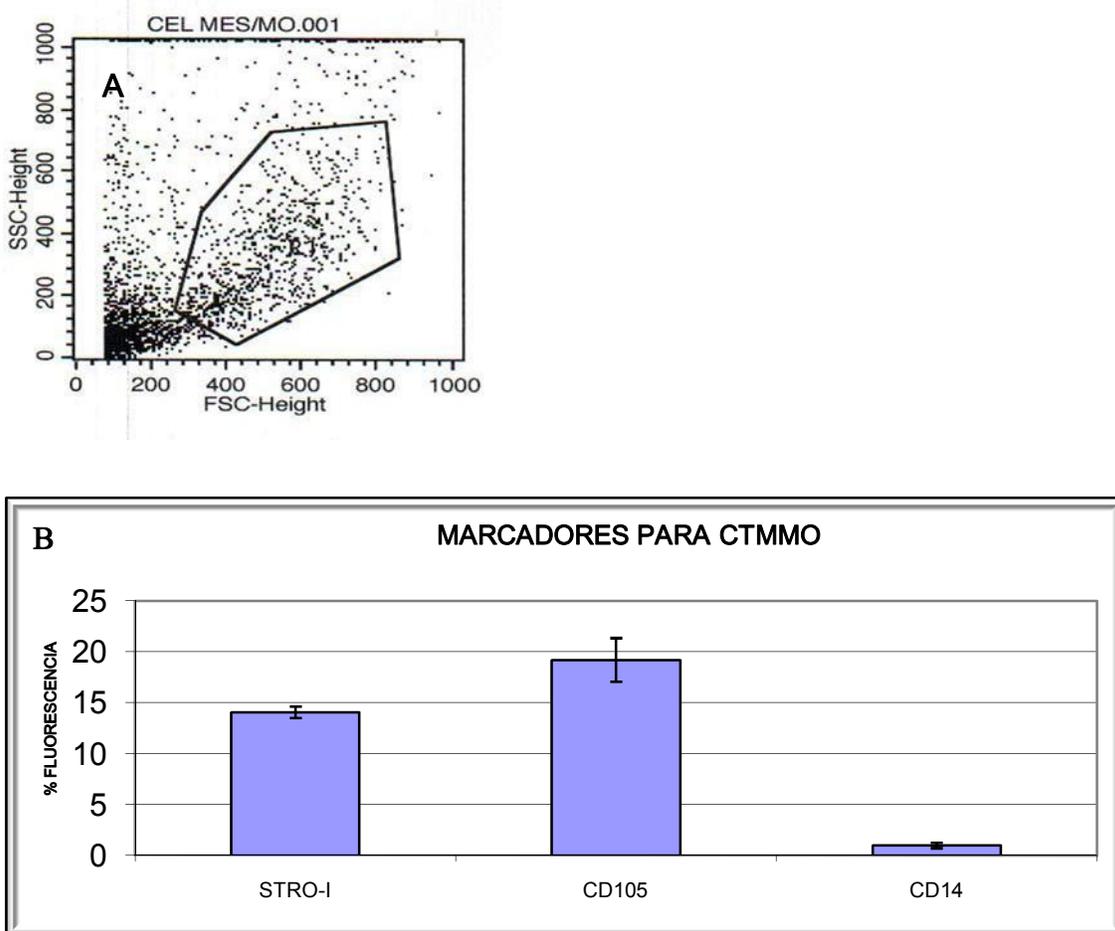


Figura 5. Caracterización por citometría de flujo de las células de CTMMO. (A) Selección de la población analizada en una gráfica en Dot Plot. (B) Valores promedio del % fluorescencia, donde se muestra que las CTMMO son mayormente positivas al CD105 que a STRO-1, también se puede ver que existe un bajo porcentaje de células de origen hematopoyético (menor al 1%).

## ***DIFERENCIACIÓN DE LAS CTMMO A OSTEOLASTOS.***

Una vez demostrado que las células obtenidas de pacientes con osteosarcoma son CTMMO, se indujo su diferenciación a osteoblastos, utilizando tres condiciones diferentes de cultivo, como se describe en material y métodos. La diferenciación a osteoblastos se evaluó primero, mediante la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), a los 5, 12 y 20 días de cultivo *in vitro* (Grafica 6 A).

Como control negativo se cultivaron en medio DMEM, y se observó que el medio osteogénico suplementado con los factores de crecimiento (FCs) potencializan esta actividad enzimática (ALP) en comparación con las otras condiciones de diferenciación, además casi todos presentan una diferencia significativa con respecto al medio osteogénico a los diferentes días ( $p < 0.05$ ). También se observa que dentro de esta condición el FGFb y BMP-7 ( $p < 0.01$  y  $p < 0.03$  respectivamente) incrementan notablemente esta actividad en comparación con los otros FCs. Por otro lado, se observa un aumento en la ALP en las células cultivadas en DMEM a los 5 y 12 días, pero este es muy inferior que las demás condiciones de cultivo, además al día 20 esta actividad ha desaparecido; esto también se determinó por la prueba de t-student y se observó que en las tres condiciones de cultivo existen diferencias significativas con respecto al medio DMEM ( $p < 0.05$ ); por lo que, el incremento de las células cultivadas en DMEM es insignificante comparadas con las otras condiciones de cultivo (Grafica 6A- barras con diagonales).

Para descartar que el aumento de ALP, se debió a la proliferación celular y no tanto a su diferenciación, se evaluó la proliferación bajo las mismas condiciones de cultivo (Grafica 6B).

En esta determinación (grafica 6B), se observa que el medio osteogénico suplementado con FCs potencializan la proliferación, en comparación con las otras condiciones de cultivo, con una diferencia significativa con respecto al medio osteogénico ( $p < 0.05$ ). Y dentro de esta condición la PE-1 y EGF tienen un mayor efecto en la proliferación ( $p < 0.0001$  en cada caso). También se observa que al día 12, el FGFb y BMP-7 a pesar de tener un menor efecto en la proliferación (con respecto a la PE-1 y EGF) se observa un incremento en la ALP, lo cual indica un

incremento en la diferenciación, y este aumento se ve más marcado con el FGFb, el cual presenta, un mayor efecto en esta actividad desde el día 12 y lo mantiene hasta el día 20.

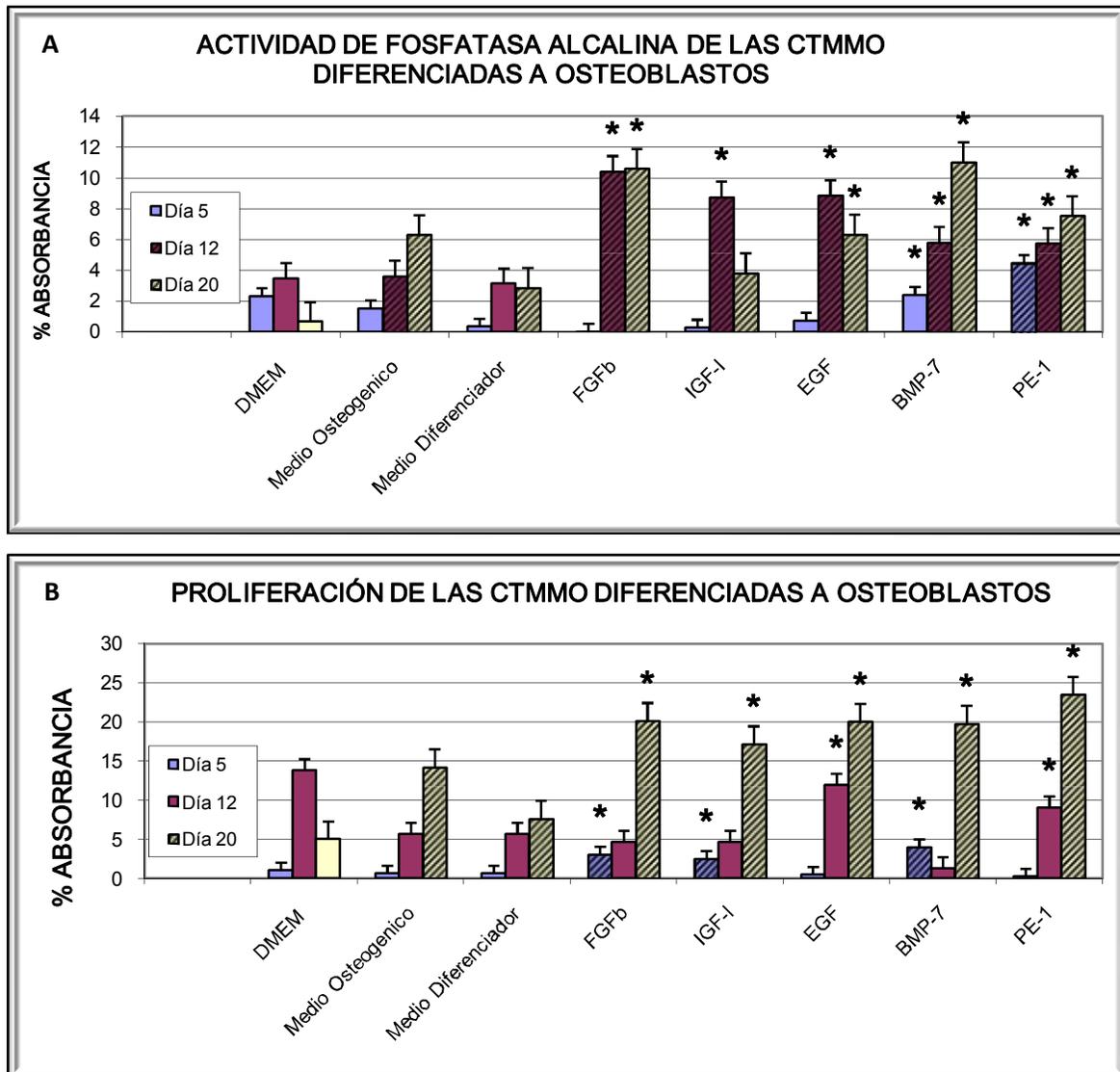


Fig. 6. Caracterización de las CTMMO diferenciadas a osteoblasto por la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y determinación de la proliferación a los 5, 12 y 20 días de cultivo *in vitro*. (A) Se observa que el medio osteogénico suplementado con los FCs, incrementan la ALP, más que las otras condiciones de diferenciación, y dentro de esta condición, el FGFb y BMP-7 son los que tienen los mejores resultados. (B) Se observa que el medio osteogénico suplementado con los FCs, potencializan la proliferación, más que las otras condiciones de diferenciación, y dentro de esta condición, la PE-1 y EGF presentan mejores resultados. Los resultados obtenidos en las dos determinaciones, se expresan en porcentaje de absorbancia con respecto al blanco. El símbolo \* indica una diferencia significativa con respecto al medio osteogénico y las barras con diagonales indican una diferencia significativa con respecto al medio DMEM, y se determinaron por la prueba estadística de t-student con  $\alpha=5\%$ .

Esta diferenciación, también se evaluó, mediante la expresión de marcadores monoclonales de fosfatasa alcalina y osteocalcina característicos de osteoblastos, y se realizó por citometría de flujo (FACS), después de la inducción, realizada por las tres condiciones de cultivo *in vitro* al día 12. En la Tabla 1 y Figura 7 se muestran los valores promedio de esta determinación.

Nuevamente se observa, que la condición que refleja mejores resultados es el medio osteogénico suplementado con FGFb, ya que presenta una mayor fluorescencia a fosfatasa alcalina y a osteocalcina, con una diferencia significativa con respecto al medio osteogénico de  $p < 0.05$  en ambos casos. También, se observa que bajo esta misma condición de cultivo, el IGF-I y PE-1 y por otro lado el medio diferenciador, presentan una diferencia significativa con respecto al medio osteogénico ( $p < 0.05$ ), pero estos valores son menores comparados con el FGFb.

TABLA 1. EXPRESIÓN DE LA FLUORESCENCIA EMITIDA POR LOS MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN OSTEOLASTICA							
	1) Medio Osteogénico	2) Medio Diferenciador	3) Medio Osteogénico				
			FGFb	IGF-I	EGF	BMP-7	PE-1
<i>F. alcalina</i>	8,69	14,61	20,15	18,15	7,07	5,24	12,92
<i>Osteocalcina</i>	8,09	2,24	9,13	8,84	6,66	3,97	1,39

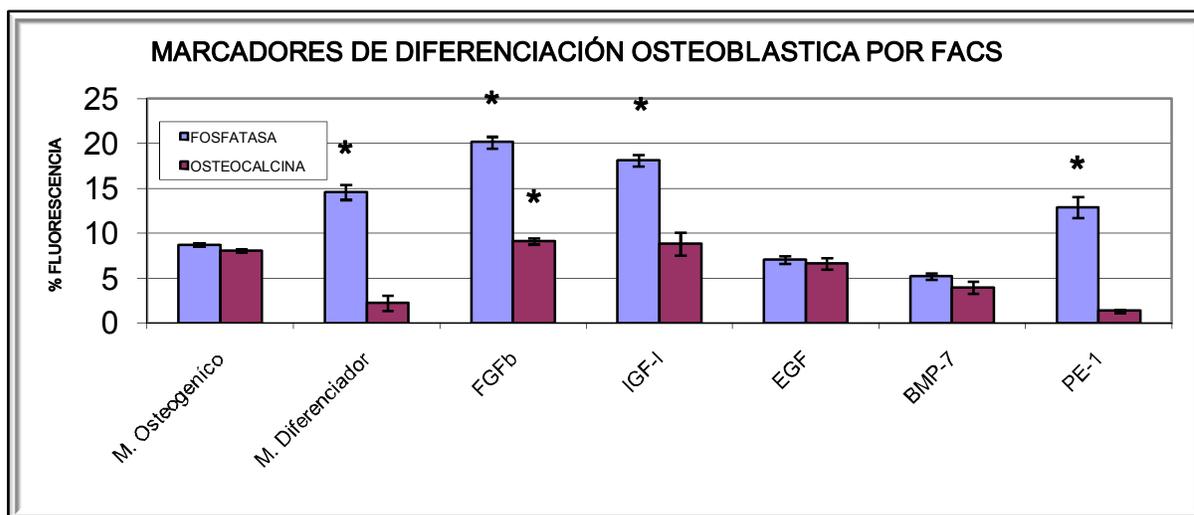


Figura 7. Caracterización de los CTMMO diferenciadas a osteoblasto por FACS. Se observan que las CTMMO cultivadas e inducidas a su diferenciación con el medio osteogénico suplementado con FGFb presentan un mayor porcentaje de fluorescencia para fosfatasa alcalina y osteocalcina con una diferencia significativa con respecto al medio osteogénico ( $p < 0.05$ ). El símbolo \* indica una diferencia significativa con respecto al medio osteogénico y fue determinada por t-student con  $\alpha = 5\%$ .

Por último, se caracterizaron los osteoblastos obtenidos por la diferenciación con las tres condiciones de cultivo. Se presentan nada más los resultados por el medio osteogénico y con el medio osteogénico suplementado con los FCs, ya que esta última condición de cultivo presentó mejores resultados. Esta determinación se realizó por inmunohistoquímica con los anticuerpos monoclonales referidos en material y métodos (Figura 8).

Los resultados mostraron, que son positivas a estos marcadores, tanto el medio osteogénico como el suplementado con los FCs. Pero con algunas diferencias.

Por ejemplo, para el anti-RUX2/CBFA1, el cual es un factor de transcripción para la regulación de diferenciación osteoblastica, se observa que en BMP-7, FGFb y EGF se tiñe el núcleo y citoplasma intensamente, en comparación con la PE-1 que se tiñe solamente alrededor del núcleo. En lo referente al IGF-1 y el medio osteogénico, se tiñe el citoplasma homogéneamente.

También se puede apreciar diferencias en la morfología celular. Por ejemplo se puede ver que en el IGF-I, FGFb y PE-1 hay células más grandes, las cuales tienen un citoplasma amplio y un núcleo grande, lo que indica una diferenciación osteoblastica, ya que las CTMMO tienen una morfología fibroblastica principalmente. En el BMP-7 y EGF hay una combinación entre células con núcleo y citoplasma grande y células con apariencia fibroblastoide.

Por otro lado, se puede apreciar que son positivas para la anti-Osteocalcina, la cual es una proteína secretada en el citoplasma y su expresión es restringida a células de linaje osteoblastico. En esta se observa, un mayor marcaje en las CTMMO diferenciadas con el medio suplementado con FCs.

Con respecto a la anti-Osteopondina, se puede apreciar que son positivas para este anticuerpo, la cual es una proteína ácida fosforilada secretada por osteoblastos y otros tejidos conectivos. Con este anticuerpo se observa que se tiñe el contorno del núcleo y citoplasma en las dos condiciones.

Y por último, se puede apreciar que son positivas para el anti-Colágeno tipo I, el cual, es el principal colágeno que se encuentra en el hueso, aunque se puede ver que tiene un marcaje muy tenue en todo el contorno del citoplasma, lo cual indica que apenas se está sintetizando este tipo de colágeno.

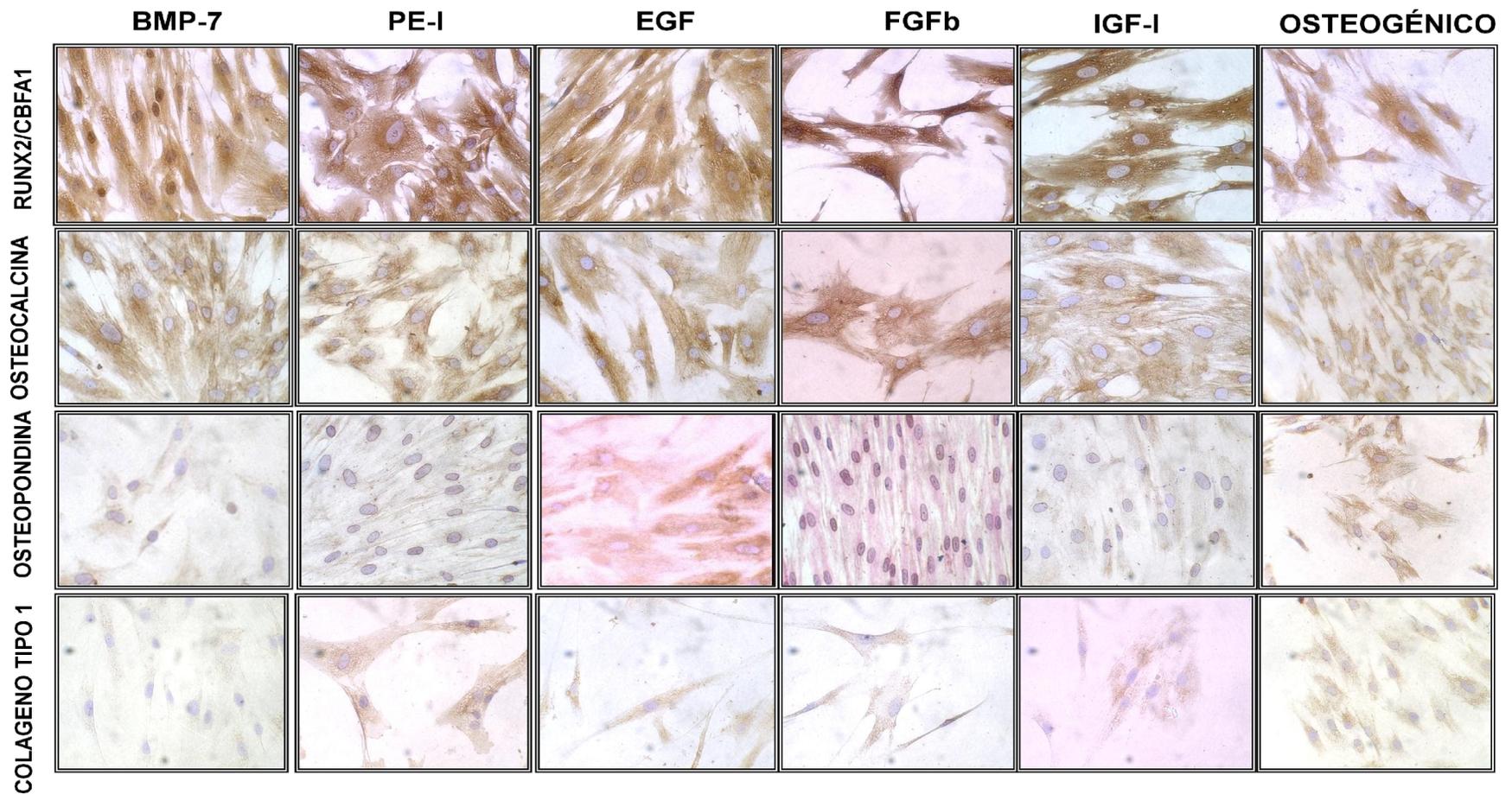


Figura 6. Caracterización por Inmunohistoquímica de las CTMMO diferenciadas a osteoblastos. Se observa que las células cultivadas en presencia del medio osteogénico y medio osteogénico suplementado con los diferentes factores de crecimiento, son positivos a los anticuerpos: RUNX2/CBFA1, Osteocalcina, Osteopondina y Colágeno tipo I, los cuales son marcadores para osteoblastos. Las fotografías fueron tomadas a 20X.

## VII. DISCUSIÓN

---

Las células troncales mesenquimales (CTM) son obtenidas de médula ósea y tejido adiposo principalmente; aunque, se han obtenido últimamente de sangre periférica, placenta fetal, ligamento periodontal, periostio, huso trabecular, entre otros (HandscheI *et al.* 2006; De Bari *et al.* 2006). Aunque las CTM provenientes de la médula ósea (CTMMO), se prefieren dada su accesibilidad y potencial de diferenciación hacia tejidos del aparato locomotor (Moosmann *et al.* 2005). Además, el método por aspiración de médula ósea es el más estudiado (Lee *et al.* 2004; Moosmann *et al.* 2005) y es el sitio, donde se encuentra mayores porcentajes de CTM que varían desde el 1% y decrecen con la edad alrededor del 0.001% de estas células nucleadas (Ibarra *et al.* 2007).

Esto se comprobó, porque en trabajos previos a la realización de este protocolo, se utilizaron CTM obtenidas del periostio de pacientes con osteosarcoma, y se obtuvo un bajo porcentaje de estas, alrededor del 1.5% de fluorescencia (datos no mostrados), obtenido por la expresión de Stro-1, el cual es un marcador comúnmente usado para detectar células de origen mesenquimal y las células positivas a este marcador, presentan un mayor potencial para diferenciarse a osteoblastos (Simmons *et al.* 1991; Zvaifler NJ *et al.* 2000). Además, estas células de periostio, tienen un menor potencial de proliferación comparadas con las obtenidas de la médula ósea, porque muchas de estas células ya presentan un compromiso a un linaje osteogénico, y a medida que progresa la diferenciación de estas células al fenotipo terminal (osteoblastos y ostiocitos), la auto-renovación se pierde gradualmente y aumenta el compromiso ó diferenciación celular (Minguell *et al.* 2001), además este bajo porcentaje puede deberse a la situación de los pacientes.

Por lo que se decidió, obtener las CTM del aspirado de médula ósea de pacientes con osteosarcoma, además de que es un método menos agresivo que una biopsia de periostio como fuente celular del tejido de reparación.

Por otro lado, para considerar a las células mononucleares obtenidas del aspirado de médula ósea como células troncales mesenquimales (CTM), deben expresar

marcadores de superficie como: CD29, CD44, CD105, CD90, Stro-1 y deben ser negativos para marcadores de linaje hematopoyético como: CD34, CD14 y CD45; además, deben ser multipotenciales, esto significa que deben tener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos ó adipocitos, porque en la actualidad, no existe un marcador específico para células troncales mesenquimales (Gronthos, *et al.* 2003; Flores-Figueroa, *et al.* 2006; Colter, *et al.* 2001). Por lo que, estas células provenientes de pacientes con osteosarcoma se caracterizaron mediante Stro-1 y CD105 como controles positivos, además, se ha encontrado que las células positivas a Stro-1, tienen una mayor potencial de diferenciarse a osteoblastos (Simmons, *et al.* 2001) y a CD14 como control negativo, el cual es un marcador presente en los leucocitos polimorfonucleares y monocitos, los cuales pertenecen al linaje hematopoyético, además están presente en la médula ósea (Friedenstein, *et al.* 1969; Flores-Figueroa, *et al.* 2006). Los resultados de la caracterización por citometría de flujo, mostró que se obtuvo un bajo porcentaje de las CTMMO, alrededor del 15 y 20% de fluorescencia emitido por Stro-1 y CD105 respectivamente, este resultado posiblemente se deba, por la situación de los pacientes, pero se ha documentado que estas CTMMO existen en un bajo porcentaje alrededor del 1:10,000 células y decrece a  $1:2 \times 10^6$  células a la edad de 80 años (Simmons, *et al.* 2001; Flores-Figueroa, *et al.* 2006; Colter, *et al.* 2001). Además, se han obtenido valores desde 0.02-1% de fluorescencia emitido por Stro-1 en pacientes sanos (Gronthos, *et al.* 2003; Colter, *et al.* 2001), por lo que estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por estos estudios. Otra posibilidad, es que existan otros grupos celulares no-hematopoyéticos presentes en la médula ósea ó otros precursores, que tengan la característica de adherirse a los platos de cultivo, la capacidad de diferenciarse hacia adipocitos, condrocitos, osteoblastos, miocitos, fibroblastos, tenocitos y que no expresen estos marcadores (CD105 y Stro-1), ya que, se ha encontrado que las CTMMO son una población celular muy heterogénea, dentro de las cuales existen por lo menos tres poblaciones, una de células chicas (referida como RS-1 y RS-2, porque presentan un mayor potencial de auto-renovación) y otras de mayor tamaño, las cuales son las células troncales mesenquimales maduras; aunque no se ha defino

perfectamente la función de cada una de ellas (Friedenstein, *et al.* 1969; Flores-Figueroa, *et al.* 2006; Lee et al. 2004; Minguell et al. 2001; Simmons et al. 1991).

También, se reafirmo por inmunohistoquímica, que estas células mononucleares obtenidas de pacientes con osteosarcoma son CTM, porque fueron positivas a Stro-1 y CD105, además negativas a CD14.

Por otro lado, se comprobó la multipotencialidad de estas células, primeramente por su diferenciación *in vitro*, hacia adipocitos (pre-adipocitos), lo cual, se demostró por la formación de vacuolas, posterior a la inducción con el medio adipogénico y la tinción con rojo oleoso. Además esta multipotencialidad se reafirmo por la diferenciación de las CTMMO hacia osteoblastos, mediante tres condiciones de cultivo: 1) medio osteogénico (dexametasona, ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato), 2) medio diferenciador (medio comercial NH OsteoDiff Médium) y 3) medio osteogénico suplementado por separado con los siguientes factores de crecimiento: BMP-7, PE-1, FGF-2, IGF-I y EGF, ya que es una característica de la célula troncal mesenquimal de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos ó adipocitos (Malewer, *et al.* 1995; Kawai, *et al.* 1999).

Por lo cual, se demuestra que las células obtenidas de la MO de pacientes con osteosarcoma son adherentes, con morfología fibroblastoide o en forma de huso, multipotenciales, positivas a STRO-1 y CD105, además negativas a CD14, en conclusión son células troncales mesenquimales.

La diferenciación hacia osteoblastos es normalmente caracterizado por su actividad enzimática de fosfatasa alcalina (ALP) y la expresión de marcadores de superficie como la osteocalcina y fosfatasa alcalina (Vega y cols. 2002; Handschel, et al. 2006; Sila, et al. 2007). Para confirmar la capacidad osteogénica de las CTMMO por las tres condiciones de cultivo, las células fueron examinadas por estas características después de la diferenciación osteogénica. Porque, la fosfatasa alcalina, es una enzima abundante en los osteoblastos y en la formación temprana de hueso; además, el incremento de los niveles de ALP es correlacionada con la diferenciación osteoblastica. Por lo que, para esta evaluación se utilizó el p-nitrofenilfosfato, debido a que, la fosfatasa alcalina (ALP)

hidroliza al p-nitrofenilfosfato, que es incoloro, produciendo fosfato y p-nitrofenolato (amarillo) leído a 405nm, el cual es proporcional a la actividad enzimática de la muestra (Balcells, 2001).

En esta determinación se observó que el medio DMEM, presentó un aumento en la ALP durante los primeros días, esto se debe, al contacto que existen entre célula y célula por las proteínas de matriz extracelular, las cuales activan vías de señalización que a su vez, activan al factor de transcripción celular Runx2/Cbfa para que se dé la diferenciación hacia osteoblastos (Salaszyk, et al. 2007), porque a medida que bajo la proliferación por este medio DMEM disminuyó esta actividad. También en esta determinación se observó que, la mejor condición de cultivo para la diferenciación de osteoblastos *in vitro*, es mediante la inducción con el medio osteogénico suplementado con factores de crecimiento, y dentro de esta condición, el FGFb es el que presenta mejores resultados en cuanto a la diferenciación hacia osteoblastos junto con el BMP-7, pero este último se utiliza a una concentración mayor de 40 ng/mL en comparación con el FGFb a una concentración de 5 ng/mL; lo cual indica que, el FGFb es una de las mejores opciones para la diferenciación de las células troncales mesenquimales de médula ósea de pacientes con osteosarcoma hacia osteoblastos, por los costos-beneficios, que en algún momento se tomarán en cuenta, para la formación de tejido óseo para estos pacientes. Además el FGFb potencializa la proliferación de estas CTMMO.

También, en esta determinación se observó que, a partir del día 12 se acentúa esta diferenciación, ya que en los diferentes artículos marcan que esta diferenciación se da en 2 semanas y otros en 3 semanas (Spitzer, et al. 2002; Simon, et al. 2002; Laurencin, et al. 1996; Becerra, et al. 2001; Simmons, et al. 1991; Nakayama, et al. 2006; Ito, et al. 2008; Chaudhary, et al. 2004), y el medio comercial en 10 días, por lo cual se decidió manejarlo a 12 días. Además, estas células (CTMMO) se van a requerir para sembrarlas en los templates o biomateriales para la formación de tejido óseo de estos pacientes en un futuro y se requiere que estas conserven el potencial de proliferación, ya que, se conoce que a medida que progresa la diferenciación de los CTMMO a osteoblastos, la auto-

renovación se pierde gradualmente y disminuye la proliferación; por lo cual, las otras determinaciones para la caracterización de osteoblastos se hizo al día 12 de cultivo *in vitro*.

Por otro lado, también se determinó esta diferenciación *in vitro* al día 12, por la expresión de osteocalcina y fosfatasa alcalina en el citómetro de flujo. La osteocalcina es una proteína de membrana, específica de hueso y secretada por osteoblastos y la expresión de esta indica una diferenciación osteoblástica. (Handscheil, et al. 2006; Sila, et al. 2007).

En esta determinación, nuevamente se evidenció, que la mejor condición de cultivo, es el medio osteogénico, suplementado con FGFb, ya que presenta mejores resultados que las otras condiciones de cultivo.

Y por último se caracterizó mediante inmunohistoquímica, a estos osteoblastos por la presencia de marcadores específicos como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, y para el factor de transcripción celular Runx2/Cbfa; lo cual evidenció que las células CTMMO inducidas hacia osteoblastos con el medio osteogénico suplementado con FGFb, presentan la expresión del factor de transcripción Runx2/Cbfa en el núcleo; porque una vez que se activa este factor, viaja al núcleo, para que se induzca la diferenciación osteoblástica (Salasznyk, et al. 2007); esto también se observó con BMP-7 y EGF.

Por lo cual, se recalca que el medio osteogénico suplementado con FGFb debe ser considerado como una opción para la diferenciación de CTMMO a osteoblastos de pacientes con osteosarcoma.

Cabe señalar que, ya caracterizados los osteoblastos de los pacientes con osteosarcoma, el siguiente paso para el proyecto del laboratorio de ingeniería de tejidos del Hospital infantil de México Federico Gómez, es la siembra en los polímeros o templates, los cuales se están seleccionando por sus características y que servirán para formar un tejido óseo en un futuro no lejano.

# VIII. CONCLUSIÓN

---

Se pueden concluir varios aspectos en este proyecto:

- Se acepta la hipótesis propuesta para esta tesis, ya que se estableció las condiciones óptimas de cultivo, para la obtención, diferenciación y proliferación de las células troncales mesenquimales a osteoblastos de pacientes con osteosarcoma.
- El mejor sitio de obtención de las células troncales mesenquimales es la médula ósea en comparación con el periostio.
- Las células troncales mesenquimales de médula ósea, obtenidas de pacientes con osteosarcoma, son de origen mesenquimal, porque se comprobó su multipotencialidad, y la expresión de marcadores presentes en este tipo de células.
- El medio osteogénico suplementado con factores de crecimiento, proporcionan un aumento en la diferenciación celular *in vitro* hacia osteoblastos, a la vez que aumenta su proliferación celular
- El medio osteogénico suplementado con el factor básico de crecimiento fibroblástico (FGFb) es la mejor condición de cultivo para la diferenciación celular *in vitro* de las CTMMO hacia osteoblastos, obtenidas de pacientes con osteosarcoma, para que en un futuro, este método se pueda aplicar en la fabricación de tejido óseo, mediante templetos o biomateriales, que es el siguiente objetivo planteado por el laboratorio de Ingeniería de tejidos del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, y así poder ofrecer un alternativa a los pacientes con estas alteraciones.

# IX. BIBLIOGRAFIA

---

- Vacanti JP, et al. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Tissue Eng* 1999; 354: s132-s134.
- Alberts, B. et al. Molecular Biology of the cell. 4<sup>a</sup> ed. 2002
- Ham Arthur W. Tratado de histología. 7<sup>a</sup>. México: Interamericana, 1985.
- Dorup J, Schacht H, Geneser F. Histología. 12<sup>a</sup>. México: Panamericana. 2006
- Bergman RA, Afifi AK, Heidger PM. Histología. México: McGraw-Hill, 1998; 68-71.
- Estrada C y cols. Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Revista EIA* 2006; 5:93-100.
- Robbins. Patología estructural y funcional. 7<sup>a</sup>. México: McGraw-Hill, 2008.
- Lane JM et al. Osteogenic sarcoma. *Clin Orthop* 1986; 204: 93-110.
- Marinaa N et al. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *The Oncologist*. 2004; 9(4): 422-41.
- Janes-Hedder et al. Childhood cancer. A parent's guide to solid tumor cancers. Second edition. O'Reilly Cambridge. EU 2002: 164-181.
- Pierz KA et al. Pediatric bone tumors: osteosarcoma, ewing's sarcoma, and chondrosarcoma associated with multiple hereditary osteochondromatosis. *J of Pediatric Orthop* 2001; 21: 412-8.
- Mejía AJM et al. Edad de aparición de los diferentes tumores malignos en la infancia. Cáncer en el niño. Epidemiología descriptiva. Ediciones Cuellar. México 2002: 289-310.
- Hoffer FA. Primary skeletal neoplasms: osteosarcoma and ewing sarcoma. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* 2002; 13(4): 231-40.
- Berman et al. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *PNAS* 2008;105(B3):11851-56.

- Kim et al. osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:2114-2130.
- Grimer RJ et al. Endoprosthetic replacement of the proximal tibia. *J Bone Joint Surg* 1999; 81-B: 488-94.
- Cara JA et al. Limb salvage for malignant bone tumors in young children. *J Pediatr Orthopaedics* 1994; 14: 112-8.
- Enneking WF et al. A system for the functional evaluation of reconstructive procedures after surgical treatment of tumors of the musculoskeletal system. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1993; 286: 241-6.
- Malawer MM et al. Prosthetic survival and clinical results with use of large-segment replacements in the treatment of high-grade bone sarcomas. *J Bone and Joint Surgery* 1995; 77-A(8): 1154-65.
- Kawai A, Healey JH, Boland PJ, Athanasian EA, Jeong DG. A rotating-hinge knee replacement for malignant tumors of the femur and tibia. *J Arthroplasty* 1999; 14(2): 187-96.
- Ayoub KS et al. Extensible endoprostheses of the humerus after resection of bone tumors. *J Bone Joint Surg* 1999; 81-B: 495-500.
- Braddock M et al. Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News Physiol Sci* 2001; 16: 208-213.
- Ramoshebi L. et al. Tissue engineering: TGF- $\beta$  superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4: 1-11.
- Langer R and Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
- Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1(1): 102.
- Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1):72-84.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4(8):743-65.
- Spitzer RS, Perka C, Lindenhayn K, Zippel H. Matrix engineering for osteogenic differentiation of rabbit periosteal cells using alpha-tricalcium

phosphate particles in a three-dimensional fibrin culture. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(4): 690-696.

- Simon CG, Khatri CA, Wight SA, Wang FW. Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Orthop Res* 2002; 20(3): 473-482.
- Laurencin CT, Attawia MA, Elgendy HE, Herbert KM. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices. *Bone* 1996; 19(1): 93S-99S.
- Friedenstein et al. Heterotopic transplantation of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1969; 6: 230-247.
- Becerra et al. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin* 2001; 116: 23-34.
- Lakshmiopathy et al. Stem cell plasticity. *Blood reviews* 2005; 19: 29-38.
- Munévar J C. Becerra A P. Hernández A M. *Biología de las Células Stem. Nova - Publicación Científica* 2005; 3(3): 1794-2470.
- Lechner Victoria. Stem Cells: Proyecciones en ingeniería de tejido. *Rev. Ped. Elec.* 2007;4(1):17-21.
- Flores-Figueroa E, et al. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Invest Clin* 2006; 58(5): 498-511.
- 38.- Colter et al. identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *PHAS* 2001; 98(14): 7841-7845.
- Gronthos S. et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Science* 2003; 116: 1827-1835.
- Simmons et al. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78: 55-62.

- Walker PA et al. Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation. *Disease Models & Mechanisms* 2009; 2: 23-38
- Molina Fidencio C. Marcadores Bioquímicos de Remodelado Óseo *Rev Metab Oseo Min* 2003; 1(3):91-98.
- Lieberman JR et al. The role of Growth Factors in the repair of bone. *J bone and joint Surgery* 2002; 84-A (6): 1032-1042.
- Maldonado JG y cols. Factores de crecimiento I. *IATREIA* 1996; 9: 83-87
- Ganong FW. *Fisiología Médica*. 14a ed. México: Manual Moderno, 1994: 921p
- Vega Alvarez JA y cols. Bioquímica y biología del cartílago articular. *Rev. Ortop Traumatol* 2002; 5: 391-400.
- Barbeito C. y cols. Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. *Analecta Veterinaria* 2005; 25 (1): 8-27.
- Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; (5): 469-484.
- Handschel J et al. Cell-based bone reconstruction therapies cell source. *J Oral Maxillofacial Implants* 2006; 21: 890-898.
- Kim, Kyobum and Fisher, John P. Nanoparticle technology in bone tissue engineering. *Journal of Drug Targeting* 2007; 15(4): 241–252.
- Nakayama Y et al. insulin-like factor-I increases bone sialoprotein (BSP) expression through fibroblast growth factor-2 response element and homeodomain protein-binding site in the proximal promoter of the BSP gene. *J Cell Physiol* 2006; 208(2): 326-35.
- Arrieta Oscar, Sotelo Julio. Factores de crecimiento en tumores cerebrales: un blanco terapéutico. *Mensaje Bioquímico* 2005; 29: 29-41.
- Bosque Gómez AR. Proliferación vascular inducida por genes. *Rev Fac Med UNAM* 2001; 44 (1): 38-40.
- Ornitz MD, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001; 2 (3): 3005.1-3005.12.

- Ito T et al. FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- $\beta$  signalling. *Cytotechnology* 2008; 56: 1-7
- Kawazoe Y. et al. Activation of the FGF signaling pathway and subsequent induction of mesenchymal stem cell differentiation by inorganic polyphosphate. *Int. J. Biol. Sci.* 2008; 4(1): 37-47
- Chaudhary LR et al. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* 2004; 34(3): 402-11.
- Panagiota A. et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 462-471.
- Antosz ME et al. effects of transforming growth factor  $\beta$  and epidermal growth factor on cell proliferation and formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells. *J Physiol* 1989; 140: 386-395.
- Hernández FC et al. Análisis biomecánico del efecto del factor de crecimiento epidermal y ácido ascórbico para acelerar la consolidación ósea. En un modelo experimental en tibia de rata. *Acta orthop scand* 2006; 67(4): 407-417.
- Kang Y et al. in vitro and in vivo induction of bone formation base don adeno-associated virus-mediated BMP-7 gene therapy using human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol* 2007; 28(6): 839-849
- Terheyden H et al. Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 469-478.
- Ueda K et al. Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E<sub>1</sub> in infants with cyanotic congenital heart disease. *J Pediatr* 1997: 834-836.
- Marks S et al. Local infusion of prostaglandin E<sub>1</sub> stimulates mandibular bone formation in vivo. *J Oral Pathol* 2001; 17: 500-505.

- Harada S et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> in osteoblasts. *J Clin Invest* 2004; 93: 2490-2496.
- Sila M et al. Osteoblast differentiation by strontium induction. *J Med Sci* 2007; 53: 25-35
- Martínez MR y cols. Tratamiento del osteosarcoma: experiencia de 10 años en el Hospital General de México. *Gamo* 2004; 3(2): 38-40.
- Zhou et al. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro?. *Chin Med J* 2006; 119(15): 1278-1286.
- Moosmann S et al. Milieu-adopted *in vitro* and *in vivo* differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. *Cell Tissues Organs* 2005; 179: 91-101.
- De Bari C et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1209-21.
- Lee RH et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14 (46): 311-324
- Minguell JJ et al. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226(6): 507-520.
- Zvaifler NJ et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-488.
- Balcells Alfonso. La clínica y el laboratorio. 18ª edición, 2001, Editorial Masson. México.
- Cons Molina F. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. *Rev Metab Oseo Min* 2003; 1(3):91-98.