

## Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica

Tissue engineering: application of pluripotent stem cells in traumatology and orthopedic surgery

Forriol F, Esparza R

Área de Investigación. Hospital FREMAP Majadahonda.

### Resumen

La ingeniería de tejidos en cirugía ortopédica está adquiriendo mayor auge y su aplicación clínica es una realidad aunque se desconocen sus posibilidades reales. Inicialmente se comenzaron a utilizar matrices, posteriormente factores de crecimiento y, más recientemente, células cultivadas o aspiradas de médula ósea.

Se revisan las características de las células mesenquimales pluripotenciales y sus aplicaciones clínicas.

#### Palabras clave:

MSC, cultivo celular, marcadores celulares, médula ósea.

### Abstract

Tissue engineering in orthopedic surgery is becoming increasingly popular, and its clinical application is a fact though the true possibilities of the technique are not known. Matrixes were initially used, followed by growth factors and, more recently, cultured cells or cells obtained from bone marrow aspirates. A review is made of the characteristics of pluripotent mesenchymal cells and their clinical applications.

#### Key words:

Mesenchymal stem cells, cell markers, bone marrow.

### Introducción

La ingeniería tisular puede definirse como la utilización combinada de células, biomateriales y factores bioquímicos para reparar tejidos lesionados o enfermos. Es un campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de la biología para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular [1-3]. Actualmente la ingeniería tisular combina el aporte de células, indiferenciadas o no, que se colocan sobre una matriz a la cual se pueden añadir factores que aceleren su proliferación e indiferenciación para ser trasplantadas a la estructura dañada y conseguir su regeneración. También las células se pueden tratar en el laboratorio para que liberen sustancias beneficiosas para la reparación de los tejidos.

La ingeniería tisular comprende la combinación de células vivas, en un molde, para reproducir una estructura tridimensional tisular que sea funcional y semejante al tejido que debe reemplazar. Se han utilizado diferentes estrategias combinando matrices biocompatibles, factores de crecimiento, trasplantes celulares y terapias de liberación génica [4], cuyo objetivo final es recapitular la estructura y la función del tejido original. Por su parte, los criterios que se deben seguir son [5,6] producir un número suficiente de células y tejido para conseguir la reparación completa, mantener y diferenciar las células hacia el fenotipo correcto, asegurar que tanto las células como los tejidos adoptan la organización tridimensional necesaria y producen matriz extracelular. A veces, se requieren moldes biorreabsorbibles hasta que las células son capaces de producir su propio medio. Además, las células y los tejidos deben adaptarse e integrarse a las demandas del tejido que van a reparar, conseguir una integración completa y una vascularización adecuada con el tejido local y, siempre, hay que valorar el riesgo de un rechazo inmunológico.

#### Correspondencia

F. Forriol  
Hospital FREMAP  
Ctra Pozuelo, 61. 28220 Majadahonda, Madrid  
francisco\_forriol@fremap.es

Estos tres aspectos, células, factores de crecimiento y señales, junto con la estabilidad mecánica del propio ambiente constituyen lo que Giannoudis et al [7] han denominado el concepto de diamante. Tres aspectos biológicos controlados en su vértice por la mecánica. No podemos olvidar que la reparación ósea es sensible a la estabilidad mecánica. La ley de Wolff es un principio que siempre debe ser tenido en cuenta. Los factores biológicos, las células, la matriz donde se depositan y los factores que determinan la cascada de fenómenos que llevan la osificación a buen puerto podrán alcanzar su comportamiento sin una buena condición mecánica. Un déficit en cualquier punto del ciclo de reparación de una fractura altera la secuencia lógica y predispone a las complicaciones [8].

El tercer componente de la ingeniería tisular y centro de interés de nuestro estudio son las células troncales pluripotenciales (MSC). Las MSC se caracterizan por tres propiedades: autorrenovación, capacidad de desarrollarse en múltiples líneas celulares y el potencial de proliferar sin límite [9]. Estas características las aproximan al concepto y fenotipo de célula tumoral. No es de extrañar que, en 1875, Cohnheim propusiera el cáncer como el desarrollo de una célula madre embrionaria desubicada en el organismo adulto que derivan en un proceso neoplásico [10].

Sabemos que las MSC, adultas y embrionarias, se vuelven inestables en cultivos *ex vivo* de larga duración. Las MSC de adulto humanas permanecen genéticamente estables durante los periodos habituales de expansión *ex vivo* de 6 a 8 semanas que se utiliza en los ensayos clínicos.

Las MSC poseen una gran capacidad para la auto-renovación y la capacidad de migrar a distintas partes del cuerpo, sobrevivir e incluso establecer nuevas colonias. No es difícil de comprender que una MSC sana degenera en una MSC cancerígena, pues como cualquier otra célula madre de nuestro organismo se pueden ver afectadas por agentes cancerígenos [11-13].

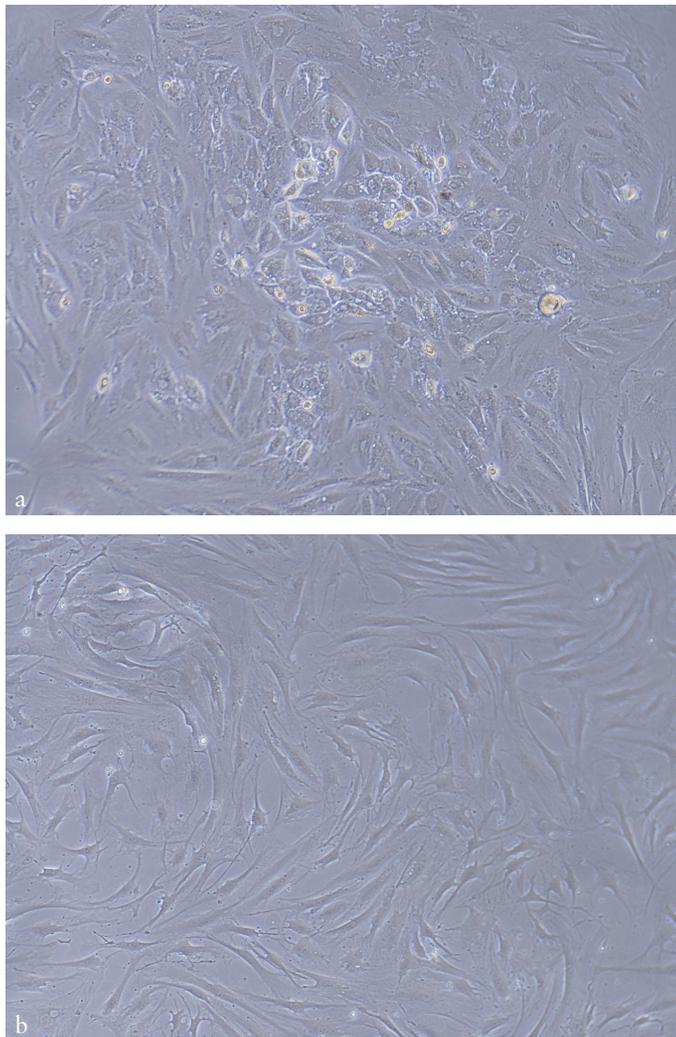
Decimos que son mal llamadas pues no son células primarias que necesitan de un mecanismo para proliferar por sí mismas. Al contrario, son células indiferenciadas que por mecanismos externos pueden dirigirse, por diferentes vías, hacia líneas celulares distintas. La literatura anglosajona las conoce como células mesenquimales troncales (*mesenchymal stem cell*, de ahí la abreviatura MSC), aunque mejor se las debería llamar células pluripotenciales, por su capacidad para originar, desde una célula indiferenciada, otro tipo de células diferentes. Desde que se ha visto que tanto las células derivadas del tejido adiposo como de la médula ósea, se pueden diferenciar en células ectodérmicas, neurales tampoco parece adecuado el término «mesenquimal».

Las MSC postnatales pueden producir tejidos normales desde diferentes capas embrionarias y, también, transformaciones extraordinarias de hueso en cerebro, de cerebro o músculo en sangre. Si se confirman estos hallazgos querrá decir que el rango de capacidad de diferenciación es similar al de las células embrionarias que permanecen en el esqueleto, después del nacimiento, en diversas localizaciones, como la médula ósea, tejido adiposo, paredes venosas, sangre periférica, placenta fetal y materna, ligamento peridontal, periostio y hueso trabecular [14]. Sin embargo, las características de las células troncales varían en su capacidad para replicarse sin diferenciarse y el potencial de desarrollo multilineal permiten generar no sólo hueso y cartílago, también tendones, músculos, grasa y estroma medular.

Las fuentes celulares en la ingeniería de tejidos incluye células autólogas, alogénicas y xenogénicas. Cada una de estas categorías se puede subdividir dependiendo del estado de diferenciación celular. Hay tres grupos de células no alteradas genéticamente utilizadas en ingeniería tisular. En primer lugar, están las células indiferenciadas de origen embrionario o umbilical, frente a las células diferenciadas, las que caracterizan a cada tejido del organismo, como pueden ser los osteoblastos, condrocitos, hepatocitos, neuronas, etc. (Figura 1). Entre ambos, disponemos de un grupo de células intermedio, sin diferenciar, conocidas como MSC o células troncales del adulto, que pueden dirigirse hacia líneas celulares muy distintas. Según la capacidad de diferenciación, hay tres grupos de células, células sin restricción capaces de diferenciarse en cualquier línea, células multipotenciales y células determinadas.

Las células estromales multipotenciales son conocidas desde 1968, cuando Friedenstein et al establecieron que había unas células adherentes, que formaban clones, no fagocíticas y fibroblásticas, definidas como *colony-forming units - fibroblastic* (CFU-Fs) que pueden ser aisladas del estroma de la médula ósea de los organismos nacidos (Figura 2). Como señalaron Friedenstein et al [15,16] pueden proliferar en condiciones experimentales adecuadas en un amplio espectro de tejidos conectivos diferenciados, incluyendo cartílago, hueso, tejido adiposo, fibroso y estroma mieloide [16,17].

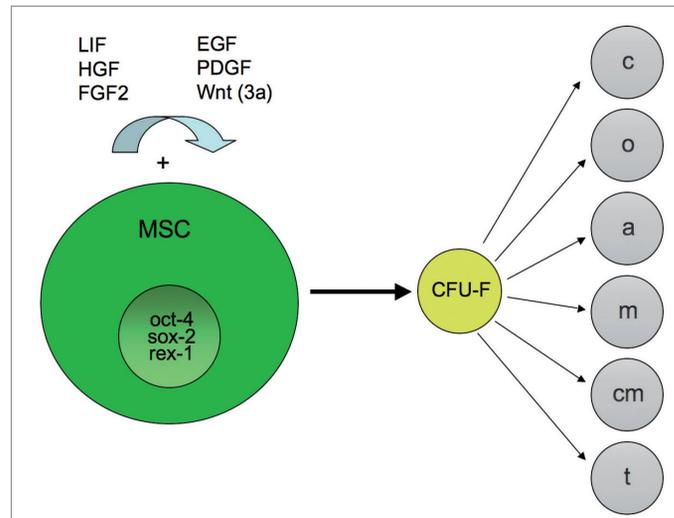
Las MSC del adulto tienen ventajas y son más utilizadas que las embrionarias pues, no plantean ninguna barrera ética ya que se encuentran en muchos puntos del organismo, son relativamente fáciles de obtener, no tienen problemas inmunológicos y han demostrado una efectividad superior a la de las células embrionarias, sin observarse tumores de nueva aparición relacionados con las células embrionarias. Las células embrionarias tienen el peligro de rechazo mientras que las MSC del adulto se pueden obtener de reservorios



**Fig. 1.** Cultivo de células primarias a) células meniscales, b) células sinoviales.

del organismo como son el hueso trabecular, periostio, membrana sinovial, músculo, dermis, peicitos, sangre, tejido adiposo y médula ósea.

Las MSC permanecen en el organismo después del nacimiento y se encuentran en diversas zonas, como la médula ósea, el tejido adiposo, las paredes venosas, la sangre periférica, la placenta fetal y materna, el ligamento peridontal, el periostio, el hueso trabecular, etc. También se han aislado de otros tejidos no mesodérmicos como son el cerebro, bazo, hígado, riñón, pulmón, timo y páncreas de ratón. Todas las células mantienen una morfología similar e inmunofenotipo después de muchos pasajes. Sin embargo, las características de las células troncales obtenidas de un sitio o de otro varían. También varían de un paciente a otro y desconocemos el mecanismo que siguen estas células después de su implante.



**Fig. 2.** Las colony-forming units - fibroblastic (CFU-Fs) son células adherentes, que forman clones, no fagocíticas y fibroblásticas, que pueden ser aisladas del estroma de la médula ósea de los organismos nacidos.

Además, disminuyen con la edad. La celularidad de la médula ósea disminuye con la edad aunque se pueden obtener, en mayor o menor cantidad, en todos los pacientes de cualquier edad. Cabe pensar que migran aunque no se encuentran en mucha cantidad por la sangre periférica. Tampoco sabemos como se integran en la cascada reparadora después de una lesión, ni tampoco los mecanismos de replicación y los factores de crecimiento y las citoquinas que dirigen este proceso empiezan a adivinarse, pero queda un largo camino por recorrer.

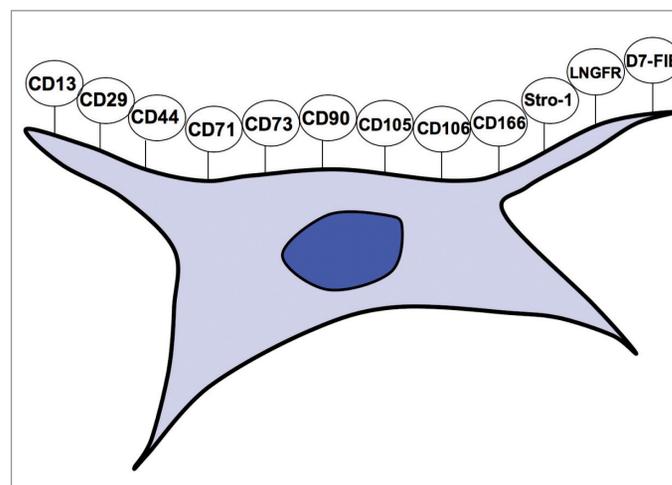
Sin embargo, todavía no disponemos de unos criterios fenotípicos bien definido que caracterice a las MSC pues no sabemos que un marcador de superficie único identifique correctamente y con seguridad las MSC. Por ello, es necesario efectuar tinciones fenotípicas, positivas y negativas, que permitan conocer estas células, aunque no están libres de discusión. Esto se complica con el hecho de que las MSC eligen hechos comunes con otros tipos celulares como pueden ser las células endoteliales, epiteliales o musculares. Las MSC expresan varios tipos de marcadores de superficie como CD9, CD10, CD13, CD44, CD54, CD55, CD90, CD105, CD166, D7-FIB y son negativas para CD14, CD34, CD45 y CD133 (Tabla 1).

Cuando se aíslan por fraccionamiento por gradientes de densidad, permanece una mezcla heterogénea de células con una proliferación variada y diferentes potenciales de proliferación. Sin embargo, para una aplicación terapéutica correcta y una comprensión rigurosa de las MSC requie-

**Tabla 1.** Características del sistema estromal y hematopoyético

Sistema hematopoyético	Sistema estromal médula ósea
Células pluripotenciales en renovación continua	No necesaria renovación continua
Formación continua	Formación en momentos determinados
Fase de fluido	Fase sólida
Vida corta	Vida larga
Estructura simple (unicelular, sin matriz)	Estructura compleja (multicelular, unión con matriz)
Fenotipo inflexible	Fenotipo plástico

re una mejor definición de que es una MSC. En la Tabla 2 se establecen 16 proteínas de superficie que permiten conocer por su marcaje o porque no marcan las MSC. Además, las MSC son positivas para muchos marcadores de superficie: CD105 (SH2), CD166 (ALCAM), CD54 (ICAM-1), CD55, CD13 (APN), CD73 (SH-3,SH-4), CD90 (Thy-1) y CD44 y negativos para marcadores de superficie propios de las células hematopoyéticas como son CD34, CD45, CD14, CD31, CD133 y CD50. Las MSC no expresan CD11b, un marcador celular inmunológico; glicoporina-A, un marcador de línea eritroide o CD45, un marcador de células hematopoyéticas. Tampoco el CD31, expresado en células endoteliales y hematopoyéticas y CD117, un marcador de células troncales hematopoyéticas y progenitoras [18-20], aunque hay diferencias entre los diferentes estudios dependiendo por el método de cultivo y el estadio de



**Fig. 3.** Antígenos de superficie positivos para diferenciar las MSC.

**Tabla 2.** Antígenos de superficie identificados en el aislamiento de MSC (Kolf et al)

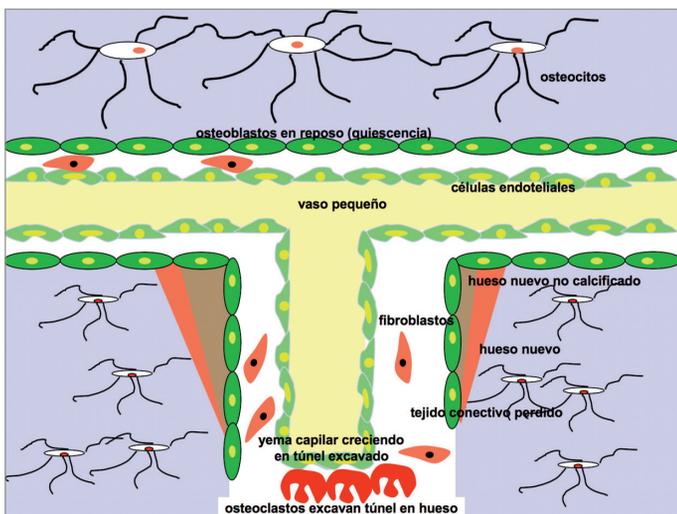
Tipo de marcaje	antígeno de superficie
Positivo	Stro-1
	CD13
	CD29
	CD44
	CD73
	CD105
	CD106
	CD166
Negativos	CD11b
	CD31
	CD34
	CD45
	CD117
Variables	Sca-1
	CD10
	CD90
	Flk-1

diferenciación celular. Hay otros muchos marcadores expresados por las MSC que no son tenidos en cuenta por su falta de consistencia en la expresión o especificidad o por falta de suficientes datos, como son CD271/NGFR, CD105, CD90/Thy-1, CD44, CD29, CD13, Flk-1/CD309, Sca-1 y CD10.

La mayoría de los marcadores son positivos o negativos igualmente en MSC humanas y del ratón, aunque el problema actual es que no disponemos de un marcador positivo, único y característico, para las MSC. Kolf et al [18] recomiendan Stro-1, CD73 y CD106 como los marcadores con mayor efectividad (Tabla 2) (Figura 3).

### Identificación y ontogenia de las células estromales de la médula

En el organismo nacido, las MSC residen en la porción luminal de los sinusoides medulares y forman una red celular tridimensional recubren la red de sinusoides. Estas dos redes salen de la ramificación de las arteriolas terminales de la médula y su capa adventicia respectivamente. Las células



**Fig. 4.** Las células estromales de la médula se establecen en la cavidad medular al formarse un anillo óseo y antes del comienzo de la hematopoyesis. El anillo óseo primitivo se erosiona por los osteoclastos para permitir la invasión vascular y la formación de una cavidad medular.

adventicias reticulares son elementos mielo soportadores que se pueden convertir directamente en adipocitos y pueden generar osteoblastos *in vivo* [21,22] (Figura 4).

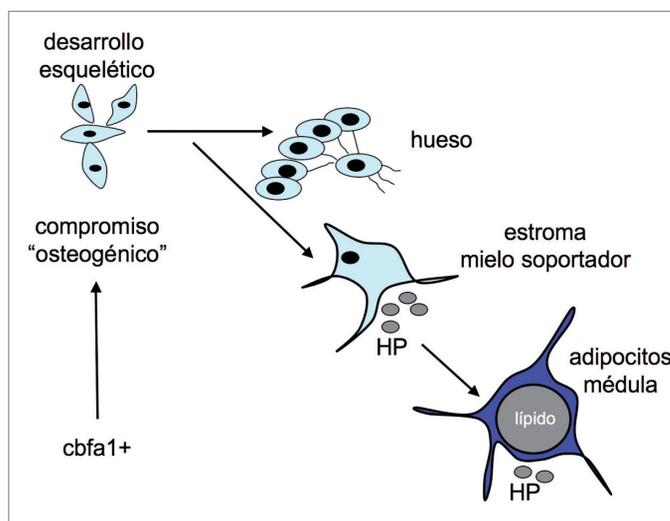
Las células estromales de la médula se establecen en la cavidad medular al formarse un anillo óseo y antes del comienzo de la hematopoyesis. Paradójicamente, aparece y funciona el tejido en el cual residen los precursores osteogénicos después de diferenciarse los osteoblastos. El anillo óseo primitivo establecido por estos osteoblastos se erosiona por los osteoclastos para permitir la invasión vascular y la formación de una cavidad medular. Los vasos traen a la cavidad medular las células osteogénicas que se han diferenciado previamente en el periostio y se disponen como células perivasculares. El desarrollo de sinusoides, caracterizados por un fluido vascular lento y muros endoteliales permeables, permiten la siembra en el medio extravascular con células hematopoyéticas troncales (HSC) que interactúan con el ambiente estromal primitivo que permite la hematopoyesis.

Finalmente, se forma una red continua de células en el espacio medular que se extiende desde el lumen de los vasos hasta las superficies óseas a través de las células estromales entremezcladas con células hematopoyéticas. Esto explica la continuidad física y biológica del hueso y la médula ósea que constituyen un órgano único. Células estromales en la primitiva médula ósea no hematopoyética que aparecen como preosteoblastos, mientras las células estromales de la

médula activa hematopoyéticamente son quiescentes mitóticamente pero siguen expresando los marcadores osteoblásticos fosfatasa alcalina a niveles elevados [23].

La formación de la cavidad medular y del estroma medular requiere el factor de transcripción *cbfa1* quien controla la diferenciación osteogénica y conduce a la formación ósea [24,25] (Figura 5).

La médula ósea es un centro para el desarrollo de ingeniería tisular, no sólo el órgano donde se encuentran dos tipos de células bien diferenciadas (HSC y SSC), también donde se pueden encontrar los progenitores de un número muy variado de tejidos. La separación entre tejido mesodérmico, tejido hematopoyético y las líneas celulares está desapareciendo pues las células capaces de regenerar los vasos sanguíneos, el músculo esquelético y el músculo cardíaco también se encuentran en la médula ósea [26-28]. El potencial inesperado para la miogénesis y la cardiomiogénesis se han adscrito tanto a las HSC como a las MSC en la médula [29-31]. Las SSC pueden, tal vez, transformarse en neuronas o glías [11], las HSC de ratón pueden regenerar las células hepáticas [32] y, también, las células capaces de regenerar el hueso se pueden encontrar en la sangre [33]. Posiblemen-



**Fig. 5.** Durante el desarrollo las células precursoras se dirigen hacia la esquelotogénesis por inducción del factor de transcripción osteogénico *cbfa1*+. Cuando se forma una cantidad determinada de hueso, estas células constituyen el estroma de la médula ósea que sirve como lecho de la hematopoyesis. Cuando la hematopoyesis es suficiente, estas mismas células cambian su fenotipo para constituir adipocitos medulares. Células de estos tres fenotipos (osteoblástico, mielosoadortador y adipocítico) forman una red continua a través del órgano hueso-médula ósea y mantienen la expresión de *cbfa1*. Las células diferenciadas son capaces de cambiar de un fenotipo a otro, dependiendo del estado metabólico del organismo.

te las HSC son, mucho más de lo que pensamos actualmente [21], células multipotenciales troncales verdaderas con potencial transgénico [32] que en condiciones normales están dedicadas a la hematopoyesis.

Las células medulares tienen la ventaja de ser fáciles de obtener y cultivar de un organismo adulto y las células HSC pueden ser aisladas y purificadas de un organismo *ex vivo*.

### Renovación o flexibilidad: tejidos, progenitores y moléculas

Muchos tejidos con células adultas contienen poblaciones de células con capacidad para renovarse después de un trauma, enfermedad o con la edad. El problema que se plantea es si son sólo las MSC o es el conjunto de células del tejido las que se diferencian, cada una de ellas, en dos o tres líneas [14]. Las células postnatales diferenciadas del sistema estromal pueden adoptar fenotipos alternativos de otras células del mismo sistema, tanto *in vivo* como *in vitro*. La deformación de las células adipocíticas de médula del conejo nacido puede revertir al fenotipo osteogénico cambiando las condiciones del suero [34]. También las células reticulares adventicias humanas fosfatasa alcalina positivas, que normalmente funcionan como elementos mielosoportadores, pueden acumular grasa de forma rápida y aparecer como adipocitos actuando como mielosupresores *in vivo*. Estas células son capaces de girar dinámicamente entre dos fenotipos «terminales» reconocidos (reticular y adipocito) de la progenie de las MSC [22]. Este fenómeno refleja la plasticidad del sistema estromal de la médula ósea y se diferencia del sistema hematopoyético. La plasticidad de los fenotipos diferenciados en el sistema estromal implica que el compromiso y la diferenciación pueden ser no irreversibles, tanto en células completamente diferenciadas como en condrocitos hipertróficos o células mielosoportadoras. Por otro camino, las células estromales siguen la corriente de una MSC putativa indiferenciada que puede diferenciarse simultáneamente y multipotencial.

La fase sólida de los tejidos mesodermales necesita ser plástica. La relevancia fisiológica de los fenómenos de la remodelación de la matriz en organismos en crecimiento, la integridad de los tejidos se ha ilustrado con el ratón MT1-MMP deficiente, un ratón con un fenotipo de membrana tipo 1 metaloproteína de matriz deficiente en el cual la remodelación del tejido conectivo está bloqueada como resultado de una degradación de la matriz llevando a cambios adversos en el tejido mesodérmico [35].

La remodelación y adaptación coordinada de tejidos de interfaz (hueso/tendón, hueso/ligamento, hueso / cartílago, tendón / músculo) durante el crecimiento orgánico requiere que

las uniones físicas entre los diferentes tejidos sea capaz de girar en el espacio. Plasticidad y multipotencialidad de las células residentes en el tejido mesodérmico puede ser crucial en tejidos conectivos y sus progenitores como la autorrenovación es para la sangre y las células hematopoyéticas.

La renovación y los patrones asociados de replicación celular y diferenciación sirve para el relleno de células no adherentes de corta vida en un organismo de larga vida, mientras que la flexibilidad fenotípica y la flexibilidad en el control de la transcripción durante la diferenciación sirve para la adaptación de los tejidos [24]. La renovación se refiere a los patrones biológicos y mecanismos que preservan el estado troncal indiferenciado [18]. Se han utilizado *arrays* genómicos para identificar firmas moleculares que mantienen el estado troncal de las células, incluidas las MSC [36].

La liberación de factores que estimulan las células troncales *in situ* para iniciar la regeneración de un tejido, más que su cicatrización, es un hecho que empieza a ser conocido y depende de la dosis, falta de factores locales activos e incapacidad para mantener un factor presente el tiempo necesario. Para superar estos problemas han surgido las «matrices activadas génicamente» que captan las células *in vivo*. Si la reconstrucción fue la frontera inicial de la ingeniería tisular, la corrección genética es la siguiente.

Las células troncales son el ingrediente crítico en la regeneración tisular pero también son la diana crítica de cualquier estrategia llamada a corregir un defecto genético [22].

### Aislar las MSC

Se disponen de numerosos protocolos para obtener MSC. Los métodos más sencillos incluyen su característica de células adherentes, por lo que fueron descubiertas por Friedenstein et al [15]. Se coloca un pequeño trozo de hueso directamente en el interior de un frasco de cultivo o sobre una placa y las células crecen sobre la base de plástico del frasco.

Una modificación de este protocolo incluye la densidad de centrifugación de la médula ósea que incluye el uso de soluciones de alta densidad con baja viscosidad y baja presión osmótica, para conseguir la fracción mononucleada de la médula ósea que contiene MSC. Subsecuentemente, la adherencia al plástico se produce en la población de MSC. El número inicial de MSC puede aumentar hasta un 36% con la recolección y recolocación en un nuevo frasco de la población celular inicial no adherente que es lavada (Figura 6).

Con cualquier método, el sistema debe procurar la pureza de las MSC sin contaminación con otro tipo de células, como son las hematopoyéticas. Para evitarlo se han propuesto dos técnicas muy similares la selección magnética y las célu-

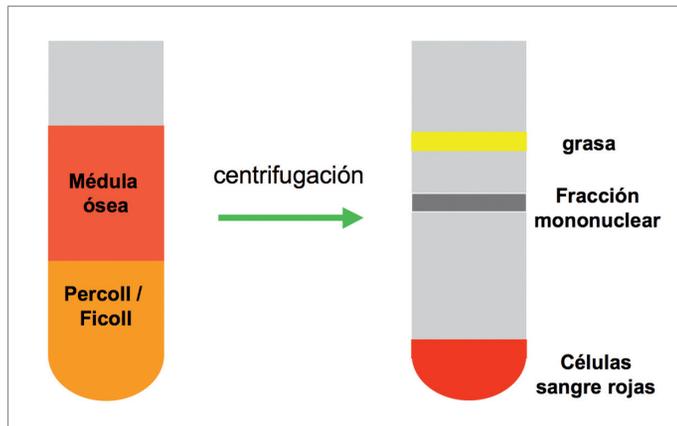


Fig. 6. Método para aislar MSC por centrifugación.

las activadas por fluorescencia. La selección magnética utiliza epitopes positivos para MSC los cuales están marcados con anticuerpos sobre bolitas magnéticas. La aplicación de un campo magnético externo separa las células marcadas positivas de las negativas. La selección de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método alternativo para aislar MSC por el cual una población de células heterogéneas, de sangre, médula ósea, etc, son caracterizadas y separadas según la intensidad de la fluorescencia que emitan. El citómetro aislará únicamente aquellas células cuya emisión de luz encuentra los parámetros definidos. Más específico es marcar uno o más anticuerpos monoclonales con una tinción fluorescente para que se una a una población específica de células. Las células según sean negativas o positivas para estos anticuerpos serán incluidas o excluidas de los tubos colectores. Se han utilizado un gran número de anticuerpos con esta técnica según el perfil fenotípico de las MSC (Figura 7).

Una fuente alternativa para obtener MSC de la médula ósea o también de tejidos sólidos, hueso, cartílago o grasa, es hacer un tratamiento con colagenasas, enzimas capaces de romper las uniones peptídicas en la triple hélice de la molécula de colágeno. De esta forma, las células se liberan del tejido y pueden ser recogidas por medio de lavado y centrifugación.

La cantidad de MSC obtenidas por este sistema del hueso es muy superior a la centrifugación de la médula ósea aunque diferentes autores sugieren que que las células obtenidas de uno y otra son idénticas, tanto en el potencial de diferenciación como de las características fenotípicas [37,38]. Sin embargo, Thomas et al [39] han llegado a la conclusión que las células aisladas por medio enzimático poseen mayor actividad metabólica, nivel de proteínas intracelulares y

producción de calcio comparado con los aspirados aunque la actividad de ALP fue menor en las células aisladas enzimáticamente [39].

### Expansión y cultivo

La expansión de las MSC puede estar afectado por diferentes factores dependientes del donante o de la técnica empleada. Pero las MSC pueden expandirse de forma considerable en un corto periodo de tiempo, con aumentos de hasta mil veces, en dos a tres semanas [40]. Además, las MSC pueden proliferar unas 19 veces sin perder su propiedad de proliferar y diferenciarse [41]. Sin embargo, la expansión reduce gradualmente el potencial máximo de diferenciación de las MSC. Las células pueden envejecer perdiendo capacidad para crecer, llegando a la apoptosis. La transcripción retroviral con un gen humano de telomerasa puede extender las células con más de 260 pases sin pérdida de su capacidad para diferenciarse en diferentes líneas [42]. Por otro lado, hay datos que sugieren que los cultivos prolongados pueden adquirir espontáneamente un potencial cancerígeno [43]. El efecto cardioprotector de las MSC se reduce después de 5 a 10 pases, posiblemente por la pérdida del potencial de liberación del VEGF [44]. Estos sueros no están exentos de problemas cuando se aplican en clínica por el potencial efecto de transmitir enfermedades y crear posibles reacciones inmunológicas.

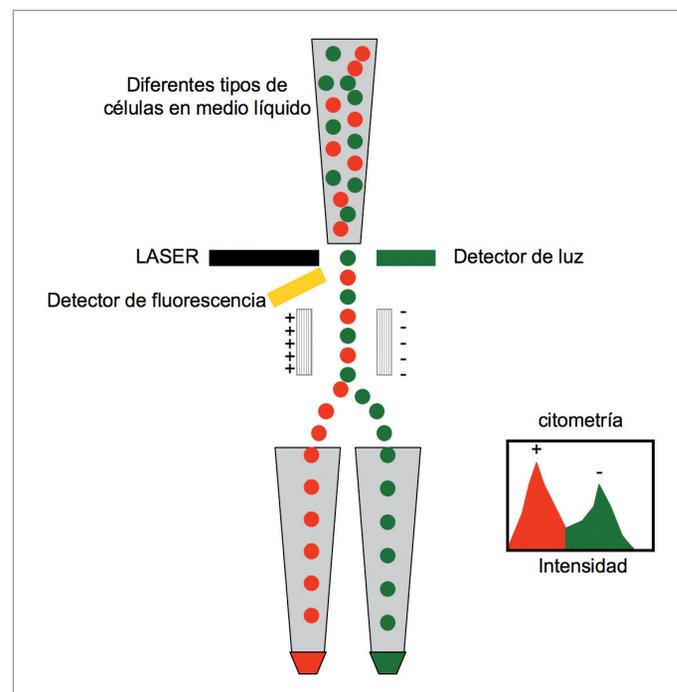


Fig. 7. Método para aislar MSC por fluorescencia.

Otro tema de interés es la forma de cultivar las células. El cultivo monocapa es el más clásico y económico para expandir las MSC. Los cultivos en monocapa crecen en frascos de vidrio o de poliestireno, discos o frascos de cultivo. Los recipientes de plástico se tratan de forma adecuada para obtener una buena adherencia celular a la pared del frasco. El cultivo celular requiere, además, una temperatura de 37° y una atmósfera humidificada con un 95% O<sub>2</sub> y suplementada con un 5% CO<sub>2</sub>. Generalmente el medio de cultivo se cambia cada 2 o 3 días y cuando las células alcanzan la confluencia son tratadas con tripsina y depositadas en dos nuevos frascos.

También se han propuesto diversos sistemas para cultivar MSC tridimensionalmente incluyendo alginato, ácido hialurónico, colágeno, fibrina y quitosán y formar, así, el andamiaje para encapsular y soportar las MSC. Los inconvenientes encontrados con los sistemas 3-D es que la proliferación es más lenta y desigual [45]. Los biorreactores reproducen las condiciones ambientales de las células con una menor tensión de cizallamiento, microgravedad, mejor distribución de los nutrientes y eliminación de desechos.

#### Factores de crecimiento proliferativos

Durante la expansión se pueden aplicar factores de crecimiento para aumentar el tiempo y mejorar el rendimiento de las células. El FGF (*Fibroblast Growth factor*) es un mitógeno que puede emplearse aunque también se han descrito que produce HLA-DR e induce Stro-1 y disminuye la regulación de CD44, así como los niveles de diferenciación [46,47]. También se pueden utilizar otros factores como PDGF-BB, EGF, IGF, TGF-β1 o bajos niveles de radiación con láser.

El factor inhibidor de la leucemia (LIF), los FGFs y el Wnts (*mammalian homologues of Drosophila wingless*) [48], entre otros factores de crecimiento y citoquinas están implicados en el mantenimiento de la «troncalidad» de las MSC [48-52] (Figura 4). El FGF2 mantiene el estado troncal de las MSC prolongando su viabilidad en los cultivos [51].

#### Biología de las MSC

Las células estromales de la médula, un tipo de células que muestra una gran plasticidad son, de hecho, células perivasculares, semejantes a los pericitos retinales, las células perivasculares del sistema nervioso central. Se ha propuesto que los distritos microvasculares pueden constituir el nicho específico donde los progenitores multipotenciales son retenidos en los tejidos adultos [21].

La característica más importante de las MSC obtenidas en el hueso es su capacidad de diferenciarse en diferentes ti-

pos celulares *in vivo* e *in vitro*. Las células aisladas del aspirado de médula ósea es lo que conocemos como CFU-F (*fibroblast colony-forming units*) y muestran un potencial de diferenciación no hematopoyética. El compartimiento no hematopoyético de la médula ósea consiste en una población heterogénea de células. Morfológicamente las MSC son células fusiformes cuboides, como fibroblastos, difíciles de distinguir de las otras células obtenidas del aspirado medular. Moreno et al, [53] inyectaron aspirado de médula ósea en los callos de elongación sin encontrar resultados positivos.

Para identificar las MSC *in vitro*, los investigadores se aprovechan de dos características de estas células. En primer lugar su capacidad de adherirse al plástico de cultivo. Excepto los monocitos, las células hematopoyéticas no lo hacen y se pierden con el lavado. La segunda característica es que las MSC son positivas para un número específico de marcadores de superficie y negativos para los marcadores hematopoyéticos (Figura 3).

Las MSC son células estromales no hematopoyéticas que se aíslan inicialmente de la médula ósea aunque también de otros órganos y estructuras del adulto. Tienen una diferenciación multilineal siendo capaces de alcanzar diferentes tipos celulares como son los osteoblastos, condrocitos, mioцитos, adipocitos, tenocitos y, posiblemente, también células neurales.

Las MSC, en el organismo adulto, representan reservorios de células reparadoras sin ninguna característica específica para ningún tejido. Las señales que disparan el proceso podría ser la propia lesión, la inflamación o la necrosis. Se ha visto que estas células migran y colonizan la lesión después de su inyección intravenosa [54,55] y acuden a la lesión cuando se inyectan en la cavidad articular [56].

El trasplante de MSC en un sistema abierto, como puede ser el espacio bajo la cápsula renal genera un osículo quimérico que es una estructura que reproduce la histología y arquitectura del hueso en miniatura y compromete a los tejidos tanto donantes como receptores. Este resultado puede demostrar que las células estromales huésped proveen la estructura, mientras que las células donantes llevan la hematopoyesis. También se pueden trasplantar células en cámaras de difusión que evitan la migración de las células hematopoyéticas en los tejidos estromales. En estas condiciones se producen un abanico de tejidos conjuntivos, cartílago, hueso, fibroso y adipocitos, a partir de las células donantes [17]. Este hecho provocó que los primeros investigadores [16,17] considerasen que el cartílago, grasa, hueso y otros tejidos conectivos derivan de un ancestro común, la célula estromal.

La morfología celular y los índices de proliferación cambian considerablemente dependiendo de la habilidad para formar estructuras nodulares o multicapa. La expresión de diferentes marcadores de los fenotipos osteoblásticos, condrogénicos y adipogénicos depende no sólo de las diferentes deformaciones celulares si no también del tiempo de cultivo. Es más, en los trasplantes algunos CFU-Fs forman hueso y mantienen la hematopoyesis y adipogénesis, otras sólo forman hueso, mientras que otras construyen únicamente tejido conectivo únicamente [33].

Desde que se comenzaron a utilizar marcadores específicos se han podido conocer mejor las verdaderas células troncales estromales de la médula, una población heterogénea de células estromales adherentes que no se renuevan indefinidamente o presentan un multipotencial homogéneo [19]. Las MSC, supuestamente purificadas, reproducen todas las virtudes conocidas y también los vicios de las CFU-F de la médula como un todo, excepto que estas células se obtienen con una eficacia menor que con los protocolos iniciales.

### El nicho de las MSC

El concepto de nicho en las MSC es importante pues las MSC no están aisladas en la médula ósea de los mamíferos, así como de otros tejidos de origen mesodérmico como es el tejido adiposo, músculo, hueso y tendón. El concepto de nicho lo introdujo Schofield [57], considerando todos los elementos que rodean las MSC cuando están en su estado nativo, incluyendo las células no troncales que están en contacto con ellas, la matriz extracelular y las moléculas solubles encontradas en el mismo medio.

Todos los elementos actúan conjuntamente para mantener las células troncales indiferenciadas permanentemente. Tienen que existir señales en el nicho para que las células troncales se diferencien cuando sea necesaria la regeneración o repoblación de un tejido.

### Componentes celulares

Parece que el nicho de las MSC tiene una naturaleza perivascular (Figura 6) basado en la expresión de actina-a de músculo liso (aSMA) en las MSC aisladas y en la localización inmunohistoquímica con CD45-/CD31-/Sca-1+/Thy-1+ en células perivasculares. Además, se ha visto que las MSC se han identificado con marcadores Stro-1 y CD146 formando líneas alrededor de los vasos en la médula ósea y pulpa dental [58]. Estas células expresan aSMA y algunas expresan 3G5, un marcador celular de superficie relacionado con los pericitos. Se ha hipotetizado, incluso, que las MSC son de hecho pericitos ya que también se diferencian en osteoblastos, condrocitos y adipocitos [59]. La localiza-

ción de MSC en los nichos perivasculares le darían facilidad de acceso a todos los tejidos y contribuye a la creencia de que las MSC pueden reparar muchos y diferentes tejidos.

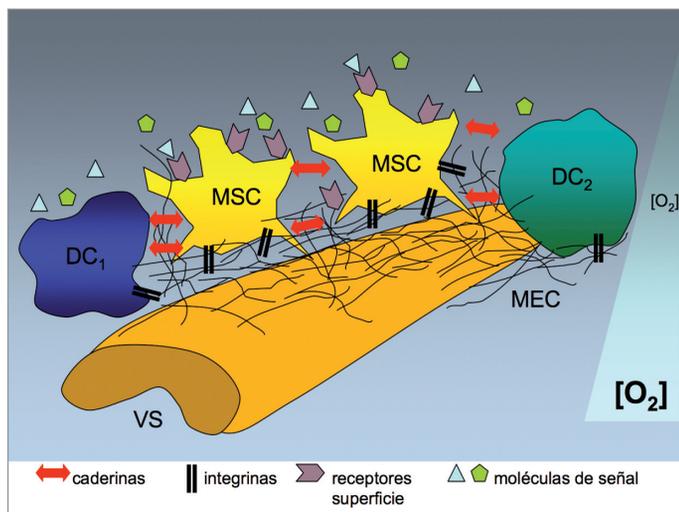
Las MSC en su nicho o «microambiente» son como plantas en el suelo, pero el microambiente de la médula ósea es muy complejo. No sólo contiene HSC y MSC, hay otros muchos tipos de células, como son los macrófagos adherentes, antígenos, células dendríticas, endoteliales y células de origen mesenquimal como son los osteoblastos y adipoblastos. Las MSC se diferencian y producen tejido mesenquimal dentro y fuera de la médula ósea incluyendo el propio estroma medular, hueso, cartílago, tendón, grasa y músculo [19].

Es necesario plantearse la pregunta de ¿si las MSC están en su propio nicho que admite HSC o, por el contrario, comparte el mismo nicho con células hematopoyéticas? Es posible que ambos tipos de células ocupen el mismo nicho dado que ambas están muy cerca unas de otras. Sin embargo, las señales extra o intracelulares necesarias para mantener el desarrollo del microambiente de ambas en la médula ósea es muy distinto. Una caracterización de las interacciones celulares, bioquímicas y moleculares de las MSC en su nicho es necesario para entender como se regulan las células *in vitro*.

Liechty et al [55] trasplantaron MSC en el útero de ovejas preñadas y fueron inyectadas en la cavidad peritoneal del feto. La oveja recién nacida fue sacrificada, 13 meses después de la inyección. Estudiando el bazo, hígado, pulmón, médula ósea, timo, cerebro, corazón, músculo esquelético, cartílago y sangre se analizaron y caracterizaron las MSC, demostrando que contribuyen de alguna forma a la formación de los condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos, células estromales de la médula ósea y estroma tímico. No se encontraron signos de rechazo lo que demuestra que tienen propiedades inmunológicas únicas, además de su características multipotenciales.

Un aspecto relevante es que el medio medular óseo es hipóxico (Figura 8). Comparando los MSC humanos cultivados en condiciones de hipoxia frente a condiciones normales (2% y 20% de oxígeno) muestran que su capacidad proliferativa es muy superior en la primera [60]. La hipoxia dobla el número de CFU-Fs presentes y mejora la expresión de oct-4 y rex-1, genes expresados por las células troncales embrionarias, fundamentales para dirigir la «tronalidad». Es decir, la hipoxia es necesaria para mejorar la proliferación de las MSC y mantener su plasticidad.

Por otro lado, no se han establecido los componentes de la matriz específicos que ayudan a mantener las MSC en su estado nativo.



**Fig. 8.** La biología de las MSC es un sistema desconocido en el que intervienen los vasos (VS), la matriz extracelular, las señales y la hipoxia.

### El mensaje y la curación de lesiones

Otro aspecto relacionado con el nicho es la transmisión de mensajes de las células troncales a los lugares de lesión y, posteriormente, su capacidad de reparar tejidos. Para ello son necesarios señales de las células troncales/progenitoras desde el nicho hasta el lugar de la lesión y diferenciarse en el tipo de célula requerida.

En animales sanos, las MSC son capaces de recibir un mensaje en muy diferentes tejidos [60]. Es interesante la capacidad de una MSC para mandar un mensaje y está relacionada, en parte, con la expresión de Stro-1 [61], mientras que las células con marcaje negativo a Stro-1 son mejores para ayudar en el anclaje y supervivencia de las HSC que son células Stro-1+ capaces de establecer señales y anclar en la mayoría de los tejidos estudiados [62].

Lo que se sabe es que las lesiones alteran el patrón de migración y diferenciación de las MSC añadidas exógenamente. Por su parte, las células dañadas son capaces de secretar no sólo señales como también señales de diferenciación. También hay que tener en cuenta que las células maduras no siempre inducen diferenciación de MSC a lo largo de su propia línea. El contacto directo con condrocitos induce osteogénesis pero no condrogénesis [63]. Evidente, el medio de una MSC es un factor crítico para definir su identidad [18].

Las MSC también se han aislado de otros muchos tejidos de origen no mesodérmico como son el cerebro, el bazo, hígado, riñón, pulmón, timo y páncreas de ratón [64], todas las células mantienen una morfología similar e inmunofenotipo después de muchos pasajes.

Desconocemos si el nicho de las MSC es común para todos estos tejidos, o tienen una función autónoma, independiente de su medio. Ojeda-Urbe et al [65] no identificaron MSC en la sangre periférica después de quimioterapia o tratamiento con factores de crecimiento; tampoco Wexler et al [66] demostraron MSC en el flujo vascular periférico. Tampoco Lazarus et al [67] consiguieron cultivar MSC de sangre periférica en pacientes tratados con quimioterapia. Sin embargo, otros autores han tenido más éxito, Luria et al [68] demostraron CFFu junto a las células nucleadas en la sangre periférica del cobaya y Huss et al [69] aislaron células tipo fibroblásticas adherentes CD34- de sangre periférica del perro. Zvaifler et al [70] por su parte, estimaron que el número de MSC, en sangre periférica, en el adulto es muy bajo, entre 0,5 – 5 por millón de las células mononucleadas. Además, Wan et al [71] demostraron que las MSC de la sangre periférica son similares a las células de la médula ósea en el conejo, a pesar de que las colonias es 20 veces superior con células de la médula ósea que de la sangre periférica, lo que demuestra que hay más MSC en la médula ósea aunque el potencial formador de hueso es muy similar en ambas fuentes cuando se utiliza el mismo número de células.

### Biología de las MSC *in vitro*

Cada vez se conoce más del proceso que dirige la diferenciación de los MSC en osteoblastos, condrocitos y tejido adiposo. En muchos casos es un sistema sencillo el que dispara las señales moleculares requeridas para inducir diferentes tipos de tejidos (Tabla 3). A nosotros, sin embargo, nos interesan las señales moleculares que dirigen los cambios a tejido óseo.

Los suplementos osteogénicos son el ascorbato, 1,25-dihidroxitiamina D3,  $\beta$ glicerofosfato y dexametasona inducen la osteogénesis *in vitro* [72-76]. La dexametasona estimula la proliferación de MSC y soporta la diferenciación de la línea osteogénica mientras que el  $\beta$ -glicerofosfato tiene funciones en la mineralización y modulación de las actividades osteoblásticas. También el ascorbato y la 1,25-dihidroxitiamina D3 inducen la osteogénesis pero también aumentan la expresión de fosfatasa alcalina y promueven la producción de osteocalcina. Más todavía, el ascorbato es una vitamina esencial implicada en la conversión de residuos de prolina en moléculas de colágeno a hidroxiprolina. Durante la osteogénesis, los fosfatos libres pueden inducir mRNA y la expresión proteica de marcadores osteogénicos, como la osteopontina [77]. Los fosfatos también tienen un efecto sobre la producción y exportación nuclear de una llave reguladora del gen Cbfa1 (*core binding factor alpha 1*) [78]. Sin olvidar que las BMP son factores de crecimiento que también se uti-

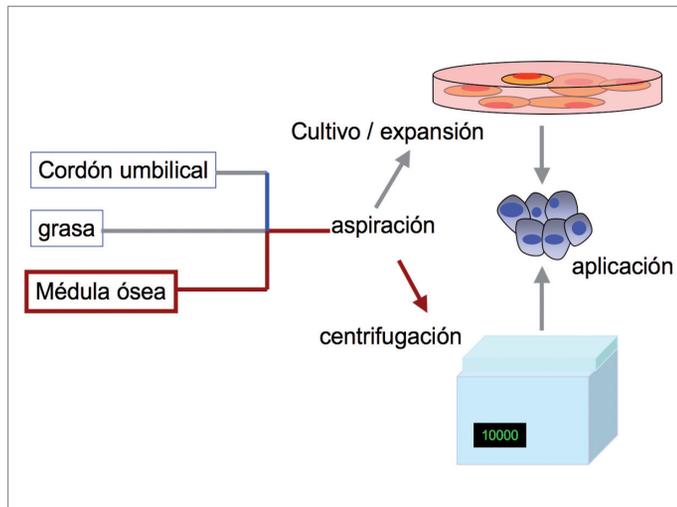
**Tabla 3. Perfil fenotípico de las MSC**

Receptores hematopoyéticos		Factores de crecimiento y citoquinas	
CD1a	neg	CD25 (interleuquina-2R)	neg
CD14 (receptor liposacárido)	neg	CD71 (receptor transferrina)	pos
CD34	neg	CD114 Granulocyte- colony stimulating factor receptor	neg
CD45 (antígeno leucocitos común)	neg	CD117 (Stem Cell Factor receptor)	neg
CD133 (AC133)	neg	CDw119 (Interferon Á R)	pos
Moléculas adhesión		CD120	pos
CD31	neg	CD121 (interleuquina 1R)	pos
CD44 (receptor hialuronato)	pos	CD123 (interleuquina – 3R)	pos
CD50 (molécula adhesión intercelular 3)	pos	CD124 (interleuquina 4R)	pos
CD54 (molécula adhesión intercelular 1)	pos	CD126 (interleuquina 6R)	pos
CD56 (molécula adhesión célula neural)	pos	CD127 (interleuquina 7R)	pos
CD58 (función linfocito – asociado antígeno 3)	pos	CD140a (PDGF receptor)	pos
CD62E (E – selectin)	neg	FGFR (FGF receptor)	pos
CD62L (L – selectin)	pos	CD271 (baja afinidad receptor nerve growth factor)	pos
CD62P (P- selectin)	neg	Otros marcadores	
CD102 (molécula adhesión intercelular 2)	pos	CD3	neg
CD106 (célula vascular adhesión intercelular 1)	pos	CD9 (tetraspanina)	pos
CD144 (cadherina 5)	neg	CD13 (aminopeptidasa)	pos
CD166 (leucocito activado)	pos	CD19 (antígeno B4 de superficie linfocito B)	neg
Integrinas		CD73 (ecto-5-nucleotidasa)	pos
CD11a (linfocito – asociado antígeno 1 a)	neg	CD80 (B7-1)	neg
CD11b (antígeno macrófago – 1)	neg	CD83 (HB15a)	neg
CD11c (receptor complementario cadena tipo 4 a)	neg	CD86 (B7-2)	neg
CD18 (linfocito función asociada antígeno- 1 b)	pos	CD90 (Thy-1 glicoproteína)	pos
CD29 (antígeno β) pos	pos	CD105 (endoglina)	pos
CD49a (antígeno α1) pos	pos	CD146 (MUC18, Mel-CAM, S-endo)	pos
CD49b (antígeno α2) pos	pos	CD157 (BP-3 o antígeno 1 células estromales médula ósea)	pos
CD49c (antígeno α3) pos	pos	SH3 (Src homología 3)	pos
CD49d (antígeno α4) neg	neg	D7-FIB	pos
CD49e (antígeno α5) pos	pos	STRO-1	pos
CD51 (vitronectina R cadena α) neg	neg	HLA-A,B,C	pos
CD61 (vitronectina R cadena β) pos	pos	SSEA-3,4	pos
CD104 (integrina β <sub>4</sub> ) pos	pos		

lizan frecuentemente en la osteoinducción [79]. El aporte de factores osteogénicos reducen el número de células hematopoyéticas presentes en el estroma medular *in vivo* [74]. La secreción de proteínas conocidas como Wnts están implicadas en diferentes programas de diferenciación, como la osteogénesis [20] mientras que la falta de expresión de la telomerasa aumenta la expansión de las MSC *in vitro* y el potencial de diferenciación osteogénica [42].

La técnica ideal de ingeniería ósea debe obtener un número suficiente de células progenitoras en la toma inicial, costo bajo y un tiempo corto de cultivo celular para poder

ser implantado por el paciente en el mismo acto quirúrgico. En los aspirados medulares, a pesar de obtener una población heterogénea, el proceso es doloroso, la fracción total de MSC presente en la médula es baja (0,001-0,01% o, aproximadamente, 1 MSC por 105 células estromales adherentes) y precisan ser cultivadas un tiempo largo *in vitro* antes de disponer de las suficientes células. Para evitar este problema contamos hoy con dos soluciones una comercializada, el sistema Harvest® de aspiración, centrifugación e implantación y la obtención de MSC del tejido graso del paciente (Figura 9).



**Fig. 9.** Obtención de MSC en clínica, zonas donantes más habituales (médula ósea, tejido adiposo o cordón umbilical) y obtención directa en quirófano y de aplicación inmediata por centrifugación o, más tardía, por cultivo y expansión.

Comparadas con las MSC de la médula ósea, las células adiposas son más fáciles de obtener, con anestesia local sin provocar dolor al paciente, y mínima morbilidad y se disponen en gran número, aproximadamente  $4 \times 10^7$  células/100 cm<sup>3</sup> de los aspirados grasos frente a  $1 \times 10^5$  células/30 cm<sup>3</sup> de los aspirados de médula ósea. Disponer de mayor cantidad de MSC en la obtención reduce la cantidad de tejido necesario y reduce o elimina el coste y una larga expansión de las células. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MacArthur BD, Oreffo ROC. Bridging the gap. *Nature* 2005; 433:19.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260:920-6.
- Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999; 354(supl)1:S32-4.
- Schneider A, Taboas JM, McCauley LK, Krebsbach PH. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res* 2003; 21:859-64.
- Hansen-Angelstaedt N, Algensatedt P, Böttcher A, Joscheck C, Schwarzloh B, Schaefer C et al. Bilaterally increased VEGF-levels in muscles during experimental unilateral callus distraction. *J Orthop Res* 2003; 21:805-12.
- Vats A, Tolley NS, Buttery LDK, Polak JM. The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg (Br)* 2004; 86-B:159-64.
- Giannoudis P, Einhorn T, Marsch D. Fracture healing: A harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury* 2007; 38(supl 4):S1-S2.
- Giannoudis P, Einhorn T, Marsch D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury* 2007; 38(supl 4):S3-S4.
- Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; 355:1253-61.
- Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 2006; 12:296-300.
- Bosch J, López-Picazo JM, García-Foncillas J, Prósper F. Células madre y cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral. *Rev Med Univ Navarra* 2007; 51:14-7.
- Clevers H. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat Genet* 2005; 37:1027-8.
- Wodarz A, Gonzalez C. Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells. *Cell* 2006; 124:1121-3.
- Handschel J, Kübler NR. Cell sources for bone reconstruction therapies. *European Musculoskeletal Rev* 2006; 71-3.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3:393-403.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6:230-47.
- Owen M. Marrow stromal cells. *J Cell Sci* 1988; 10(supl):63-76.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:204-14.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
- Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:32-45.
- Bianco P, Robey PG. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105:1663-8.
- Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001; 414:118-21.
- Bianco P, Constantini M, Dearden LC, Bonucci E. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br J Hematol* 1988; 68:401-3.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89:747-54.

25. Komori T, Yagi H, Nomura S et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89:755-764.
26. Ferrari G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-30.
27. Kocher AA et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Med* 2001; 7:430-8.
28. Ortic D et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701-5.
29. Gussoni E et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401:390-4.
30. Makino S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103:697-705.
31. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; 18:1417-26.
32. Lagasse E, Shizuru JA, Uchida N, Tsukamoto A, Weissman IL. Toward regenerative medicine. *Immunity* 2001; 14:425-36.
33. Kuznetsov SA et al. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001; 153:1133-40.
34. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991; 99:131-9.
35. Hombeck K et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999; 99:81-92.
36. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 2006; 24:1707-18.
37. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestin become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. *Blood* 2004; 104:2728-35.
38. Tuki R, Seghatoleslami MR, Tuli S, et al. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 2003; 23:37-49.
39. Thomas CB, Kellam JF, Burg KL. Comparative study of bone cell culture methods for tissue engineering applications. *J ATSM Int* 2004; 1:1-17.
40. Chen RR, Mooney DJ. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharm res* 2003; 20:1103-12.
41. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 113:1161-6.
42. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20:592-6.
43. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65:3035-9.
44. Crisostomo PR, Wang M, Wairiuko GM et al. High passage number of stem cells adversely affects stem cell activation and myocardial protection. *Shock* 2006; 26:575-80.
45. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A et al. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001; 80:2025-9.
46. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:462-71.
47. Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, et al. Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. *Bone* 2000; 27:185-95.
48. Kleber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:681-7.
49. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004; 93:1210-30.
50. Metcal D. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 2003; 21:5-14.
51. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:413-9.
52. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine FGF2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:2412-9.
53. Moreno JL, Fernández J, Forriol F, Cañadell J. El efecto de la inyección de médula ósea sobre la osteogénesis a distancia. *Mapfre Medicina*, 1998, 3:163-1.
54. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003; 108:863-8.
55. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans DR et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6:1282-6.

56. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3464-74.
57. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4:7-25.
58. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18:696-704.
59. Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999; 9:1-17.
60. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 2006; 207:331-9.
61. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004; 103:3313-19.
62. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78:55-62.
63. Gerstenfeld LC, Barnes GL, Shea CM, Einhorn TA. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res* 2003; 44(suppl 1):85-91.
64. Da Silva Meirelles L, Chagstelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119:2204-13.
65. Ojeda-Urbe M, Brunot A, Lenat A et al. Failure to detect spindle-shaped fibroblastoid cell progenitors in PBPC collections. *Acta Haematol* 1993; 90:139-43.
66. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121:368-74.
67. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL et al. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother* 1997; 6:447-55.
68. Luria EA, Panasyuk AF, Friedensteyn AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* 1971; 11:345-9.
69. Huss R, Lange C, Weissinger EM et al. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* XX; 18:252-60.
70. Tuominen T, Jämsä T, Tuukkanen J et al. Native bovine bone morphogenetic protein improves the potential of biocoral to heal segmental canine ulnar defects. *Int Orthop* 2000; 24:289-94.
71. Wang JS, Aspenberg P. Basic fibroblast growth factor increases allograft incorporation. Bone chamber study in rats. *Acta Orthop Scand* 1994; 65:27-31
72. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol* 1990; 140:132-8.
73. Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. Mechanism of action of beta-glycerolphosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 1992; 51:305-11.
74. Herbertson A, Aublin JE. Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. *J Bone Min Res* 1995; 10:285-94.
75. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64:295-312.
76. Liu P, Oyajobi BO, Russell RG, Scutt A. Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor beta and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitaminin D3 in vitro. *Calcif Tissue Int* 1999; 65:173-80.
77. Beck GR, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8352-7.
78. Fujita T, Izuno N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T et al. Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:348-52.
79. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 2003; 21:622-9.

#### Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro, a las que estamos afiliados.