



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**TERAPIA CELULAR EN UN MODELO MURINO DE  
OSTEOPOROSIS. IMPLICACIÓN DE DOS  
MODULADORES DE LA VÍA JAK-STATs.**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA JESÚS DELGADO MARTOS**

**MADRID 2010**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**TERAPIA CELULAR EN UN MODELO MURINO DE  
OSTEOPOROSIS. IMPLICACIÓN DE DOS  
MODULADORES DE LA VÍA JAK-STATs.**

Memoria presentada por la  
Lda. María Jesús Delgado Martos  
Para optar al grado de Doctor en Ciencias

Directora:  
J. Predestinación García Ruiz  
Profesora Titular de Bioquímica  
y Biología Molecular de la U.A.M  
Facultad de Ciencias

Madrid, Marzo 2010

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular bajo la dirección de la Dra. J. Predestinación García Ruiz.

**María Jesús Delgado Martos**

Lda. en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Marzo 2010



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN



**FONDO EUROPEO DE DESARROLLO REGIONAL**

Este trabajo ha sido financiado por:

Proyecto del Ministerio de Sanidad, Fondo de Investigaciones Sanitarias PI 070499.

Proyecto CIBER-BBN del Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica

Este trabajo ha sido realizado en los Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid bajo la dirección de la profesora Josefa Predestinación García. Y para que así conste firmo en Madrid en Marzo de 2010.

*A mis padres y a Gudane*

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	5
AGRADECIMIENTOS .....	9
ABREVIATURAS .....	12
RESUMEN / SUMMARY .....	15
1 INTRODUCCIÓN .....	17
1.1 Las células progenitoras y el proceso reparador del esqueleto óseo de los vertebrados.....	18
1.1.1 Breves antecedentes históricos.....	18
1.1.2 Actualidad. Nichos en la médula ósea. Vascularidad, inmunosupresión, reparación tisular.....	19
1.1.3 Factores tróficos producidos por las MSCs .....	21
1.1.4 La acción celular de los estrógenos y su relación con PRL .....	24
1.1.5 El receptor de estrógenos.....	25
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
3.1 Animales y cultivos primarios.....	32
3.1.1 Aislamiento y cultivo de células MSCs de médula ósea.....	32
3.1.2 Modelo murino de osteoporosis.....	32
3.2 Trasplantes de MSC.....	33
3.3 Histometría de la Placa de Crecimiento.....	33
3.3.1 Estereología de las trabéculas epifisarias y metafisarias en la región distal del fémur.....	34
3.3.2 Estereología de la celularidad de osteocitos, condrocitos y clastos. ....	34
3.4 Análisis estadístico.....	35
3.5 Hibridación “in situ” del gen Sry.....	35



---

3.6	Ensayos de proliferación .....	36
3.7	Ensayos de diferenciación osteocondral.....	37
3.8	Inmunofluorescencia y microscopía digital. ....	38
3.9	RT- PCR.....	38
3.10	Ensayos de Co-Cultivos 3D .....	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Modelo animal de osteoporosis.....	43
4.1.1	Aproximaciones experimentales previas. ....	43
4.1.2	El trasplante de rMSCs no generó signos de rechazo inmunológico ....	44
4.2	El trasplante de MSC en modelo animal de osteoporosis. ....	45
4.3	Valoración esterológica de reparación de las trabéculas .....	49
4.3.1	Trabéculas epifisarias .....	49
4.3.2	Trabéculas Metafisarias Centrales. ....	50
4.3.3	Trabéculas Metafisarias Marginales. ....	50
4.4	Estudio esterológico de la celularidad de osteocitos en el hueso.....	50
4.4.1	Osteocitos en trabéculas epifisarias, metafisarias centrales y marginales .....	51
4.4.2	Osteocitos en hueso supraplaca, cortical y periostio. ....	51
4.5	Condrocitos en la placa de crecimiento. ....	52
4.6	Estereología de la celularidad de OSTEOclastos en los experimentos de trasplantes de MSC.....	52
4.7	Recuperación de la síntesis de Colágeno tipo II en la placa de crecimiento.. .....	53
4.8	Efecto del trasplante de MSC en el cartílago articular y hueso cortical..... .....	54
4.9	Co-cultivo de células MSC con epífisis-metáfisis.....	55
4.10	La PRL modula la acción proliferativa de los E2 en las MSC.....	60

---

4.11	Los sistemas reguladores PRL-PRLR y E2-ER están en las MSC. ....	62
4.12	Prolactina y estrógenos participan en la regulación de la vía Jak-Stat y la dexametasona tiene una acción dominante negativa sobre el receptor de estrógenos.....	63
5	DISCUSIÓN .....	68
6	CONCLUSIONES .....	74
7	BIBLIOGRAFÍA .....	76
8	ANEXO.....	85
8.1	Parámetros estereológicos trabeculares.....	86
8.2	Parámetros estereológicos celulares .....	88

# **AGRADECIMIENTOS**

*“.....Una vez conocí a uno que terminó la tesis.....”*

Este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda de muchas personas que de una forma o de otra me han ido ayudando durante todo este camino.

En primer lugar quería agradecer a la Profesora J. Predestinación García Ruiz toda la ayuda y dedicación que me ha dado a lo largo de estos años. Gracias a ella he podido iniciarme en el mundo de la investigación.

Mi agradecimiento especial a la Profesora de Investigación Isabel Guerrero por todo lo que me enseñó durante el proyecto de fin de carrera.

A la Dra. Carmen Fernández Criado, por toda la ayuda, atención y amabilidad que me ha prestado a lo largo de mi trabajo.

Mi agradecimiento al Profesor Javier Regadera y a la Dra. I. Santos.

Muchas gracias, a la Dra. Ana Escario por todo lo que me ha ayudado y aguantado durante este periodo de tiempo, así como, al Dr. Canillas (Fernando) su permanente ánimo de que “las tesis alguna vez se acaban”.

Y como no gracias a mi amiga Carmen, gracias por todo, me has enseñado, apoyado y ayudado en todos estos años, mi gran compañera de fatiga. Laura y Vane, es una verdadera suerte el haberlos conocido, mil gracias por todo, habeis sido un apoyo enorme para mí estos últimos años. Todas vosotras sois el verdadero significado de trabajo en equipo. Sin vosotras esto no estaba escrito.

No me puedo olvidar de todo el personal de laboratorio de histología de la Facultad de Medicina: Conchita Gómez Maña, Técnico de Laboratorio, por toda su ayuda y paciencia, y Carmen Sanchez Palomo, técnico de Laboratorio por su colaboración.

Y de las que estuvieron al principio de mi estancia compartiendo laboratorio: Carmen, Almudena y Paula, gracias por todo el apoyo que aún en la distancia me seguís dando.

Gracias a las personas del Servicio de Animalario de la Facultad de Medicina: David, Miguel, Eli, Manolo, Santi, siempre atentos a “echar una mano”, siempre con “alegría y buen humor”

Toda la gente de Biolab: Nuria, Lorena, Jeny, Blanca, Raquel, Marielle, Leidy, Martha, Sonsoles. Es un verdadero placer trabajar con vosotras.

No puedo olvidarme de mis amigas de Karibu: Ana, Marta y Sara. Me habéis apoyado un motón y siempre os lo agradeceré.

Mis amigas de siempre las de los scout: Almu, Xenia, Nuria, Inés, María, Esther, Carola Helena, Paloma con las que he subido varios “tresmiles”. Siempre estaréis conmigo en las grandes aventuras y en toda clase de cuestas arriba de la vida.

Y como no, Alex, mi gran compañero que me has ayudado y acompañado en cada momento. Muchas gracias por enseñarme a ver la relatividad de las cosas.

No podría olvidarme de mis hermanos. Emilio, mil gracias, siempre estás ahí para resolverme todos los problemas que me han ido surgiendo. Carmela, mi gran competencia por el ordenador, gracias por haberme aguantado. Kiko, siempre estas el primero cuando he tenido problemas. Felisa mi gran apoyo para los momentos buenos y los no tan buenos y como no, la niña de mis ojos, Gudane, que me llena las tardes de alegría.

Por último pero no menos importante son las personas a las que les debo todo, muchísimas gracias de todo corazón, papá y mamá. Es difícil resumir en líneas mi gratitud y mi fortuna hacia vosotros. Me habéis inspirado para recorrer este camino y el haberlo podido compartir con vosotros es para mí, mi mayor suerte y orgullo.

## **ABREVIATURAS**

<b>AF-1 ó 2</b>	Activación de función -1 ó 2 ( <i>Activation Function -1 or 2</i> )
<b>Akt/PKB</b>	Proteína Quinasa B ( <i>Protein kinase B</i> )
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfato
<b>BDNF</b>	Factor Neurotrófico derivado del cerebro ( <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> ).
<b>BRET</b>	Transferencia de Energía por Resonancia de Bioluminiscencia ( <i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CFU-F</b>	Unidades formadoras de Colonias de Fibroblastos ( <i>Colony forming unit fibroblast</i> )
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CypA,B</b>	Ciclofilina A
<b>Dex, D</b>	Dexametasona
<b>DEC</b>	Dominio Extracelular ( <i>Extracellular Domain</i> )
<b>DHEA</b>	Dehidroepiandrosterona
<b>DIC</b>	Dominio Intracelular ( <i>Intracellular Domain</i> )
<b>DIG</b>	Digoxigenina ( <i>Digoxigenin</i> )
<b>DMEM-LG</b>	Medio de Eagle's modificado por Dulbecco's-bajo en glucosa ( <i>Dulbeccos's Modified Eagle medium- low glucose</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfoxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido trifosfato ( <i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i> )
<b>Dome</b>	<i>Domeless</i>
<b>E2, E</b>	Estrógenos, 17 $\beta$ -estradiol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético ( <i>Ethylen diamine tetraacetic acid</i> )
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicoltetracético ( <i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> )
<b>EMT</b>	Transición Epitelio-Mesénquima ( <i>Ephitellium- Mesenchima Transition</i> )
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>EPOR</b>	Receptor de Eritropoyetina
<b>ER <math>\alpha</math> y <math>\beta</math></b>	Receptor de Estrógenos $\alpha$ y $\beta$ ( <i>Estrogen Receptor <math>\alpha</math> and <math>\beta</math></i> )
<b>ERE</b>	Complejo Estrógenos-Receptor de Estrógenos
<b>ERK</b>	Quinasa Reguladora de señal Extracelular ( <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> )
<b>ERM</b>	Ezrina, radixina y moesina
<b>Estren</b>	3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Dihidroxi-4-ESTREN
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino ( <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>FRET</b>	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia ( <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> )
<b>Frv</b>	Fracción de volume celular
<b>GH</b>	Hormona de Crecimiento ( <i>Growth Hormone</i> )
<b>GHR</b>	Receptor de Hormona de Crecimiento ( <i>Growth Hormone Receptor</i> )
<b>GR</b>	Receptor de Glucocorticoides ( <i>Glucocorticoid receptor</i> )
<b>Grb2</b>	Factor de crecimiento de union a protein 2 ( <i>Growth factor bound protein 2</i> )
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glucógeno Sintasa Quinasa-3 ( <i>Glycogen Synthase Kinase 3 <math>\beta</math></i> )
<b>HE</b>	Hematoxilina y Eosina
<b>HSC</b>	Célula Progenitoras Pluripotencial Hematopoyetica ( <i>Hematopoietic Stem Cell</i> )
<b>HSP</b>	Proteínas de choque térmico ( <i>Heat Shock Proteins</i> )
<b>Hop</b>	<i>Hopscotch</i>
<b>ICI</b>	7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentil)sulfinil]nonil]estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol
<b>IGF-I</b>	Factor de Crecimiento a Insulina-I ( <i>Insulin-like growth factor-I</i> )
<b>Ihh</b>	<i>Indian hedgehog</i>
<b>IL-4,6</b>	Interleukina-4,6
<b>INS</b>	Inserto
<b>ITS</b>	Insulina, Transferrina y Selenio
<b>Jak2</b>	Janus kinase 2
<b>JH (1,2,3)</b>	Dominio de Homología Jak ( <i>Jak Homology domain</i> )
<b>KO</b>	Knockout
<b>LIF</b>	Factor de inhibición de Leucemia ( <i>Leukemia inhibitory factor</i> )
<b>L<sub>T</sub></b>	Longitud de la trabécula
<b>MAPK</b>	Proteína Quinasa Activadora de Mitogeno ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )
<b>MET</b>	Transición Mesénquima-Epitelio ( <i>Mesenchima-Ephitellium Transition</i> )
<b>MMCL</b>	Distancia intratrabecular
<b>MPP</b>	1,3-Bis(4-hidroxifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoksi)fenol]-1,4-pirazol diclorohidrato
<b>MSC</b>	Células Progenitoras Pluripotenciales Mesenquimales ( <i>Mesenchymal stem cell</i> )
<b>MTA3</b>	Proteína Asociada a Metástasis 3 ( <i>Metastasis Associated protein 3</i> )
<b>MTW</b>	Anchura de las trabéculas
<b>Nek</b>	Quinasa relacionada con Nima ( <i>Nima related kinase</i> )
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NLS</b>	Señal de Localización Nuclear ( <i>Nuclear Localization Signal</i> )
<b>NOD-SCID</b>	Diabetes No Obesos -inmunodeficiencia Severa Combinada ( <i>Nonobese Diabetes- Sever e Combined Immunodeficiency</i> )
<b>NR</b>	Receptor Nuclear ( <i>Nuclear Receptor</i> )
<b>Nv</b>	Número de células por unidad de volumen

<b>OVX</b>	Ovariectomia
<b>PBS</b>	Tampón Fosfato Salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción de Polimerización en Cadena ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas ( <i>Platelet Derived Growth Factor</i> )
<b>PHTPP</b>	4-[2-fenil-5,7-bis(trifluorometil) pirazol [1,5-a] pirimidin-3-y] fenol
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa ( <i>Phosphoinositide 3-Kinases</i> )
<b>PIAS3</b>	Proteína Inhibidora de Activación de STATs ( <i>Protein Inhibitors of Activated STATs</i> )
<b>Renat</b>	Renaturalización
<b>PNK</b>	Polinucleótido Kinasa
<b>PPI</b>	Peptidil Prolil Isomerasa
<b>PRL, P</b>	Prolactina
<b>PRLR</b>	Receptor de Prolactina
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>SCF-E3</b>	Skt, Cullin, F-box conteniendo el complejo E-3
<b>SCR</b>	Receptor Co-activador de esteroides ( <i>Steroid Receptor Co-activator</i> )
<b>SD</b>	Del inglés <i>Sprague Dawley</i>
<b>SIP1</b>	Proteína de Interacción con la proteína de Supervivencia de la motoneurona 1 ( <i>Survival of motor neuron protein Interacting Protein 1</i> )
<b>Sos</b>	Son of sevenless
<b>Sry</b>	Región Y determinante del sexo ( <i>Sex-determining Region Y</i> )
<b>STAT 1,3 y 5</b>	Proteína señal de la transducción y activación de la señal ( <i>Signal transducer and activators of transcription protein</i> )
<b>SLUT1E1</b>	Estrógeno sulfotransferasa
<b>TBE</b>	Tris Borato y EDTA
<b>TGF<math>\beta</math>R</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Transformante $\beta$ ( <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math> Receptor</i> )
<b>TRAP</b>	Fosfatasa Ácida Resistente a Tartrato ( <i>Tartrate Resistant Acid Phosphatase</i> )
<b>TyrK</b>	Tirosina Quinasa ( <i>Tyrosine kinase</i> )
<b>Upd</b>	<i>Unpaired</i>
<b>Vc</b>	Volumen celular medio



## **RESUMEN / SUMMARY**

## RESUMEN

En el presente trabajo analizamos la posible terapia celular en la osteoporosis mediante el desarrollo de un modelo murino de la enfermedad y el estudio del efecto de la administración de células MSCs por la vena caudal. Mediante la ovariectomía y la restricción energética en rata conduce a la pérdida del hueso trabecular de los huesos largos compatible con un modelo animal de la enfermedad degenerativa del esqueleto humano conocida como osteoporosis. La administración de MSCs no causó rechazo en los animales trasplantados y el rastro de las células trasplantadas se pierde en cuatro semanas. Los animales osteoporóticos tratados con las rMSCs recuperaron la formación de trabéculas óseas y los resultados obtenidos sugieren que la reparación ósea es el resultado de los factores liberados por las células MSCs trasplantadas. La valoración esterológica de las trabéculas muestra que las MSCs estimulan la reparación de las trabéculas epifisarias y metafisarias aumentando la longitud y anchura así como disminuyendo la distancia entre ellas. Las bases celulares de la reparación ósea han sido estudiadas en hMSCs y mostramos que la prolactina y los estrógenos son sistemas reguladores autocrinos y paracrinos que operan en la expansión de las células progenitoras de hueso y en la diferenciación osteocondral. Los resultados muestran la modulación por ambos ejes de la distribución subcelular de los factores retranscripción STAT1, STAT3 y STAT5 y el receptor de estrógenos. Los glucocorticoides realizan una modulación dominante y antagónica a la acción de los estrógenos. Estos sistemas reguladores deben ser componentes del microambiente óseo y regular la localización espaciotemporal de las células durante el desarrollo, remodelado óseo y la reparación.

## SUMMARY

In this work we have analyzed the effect of administer MSCs cells in an experimental model of osteoporosis in rats. The results show that bone marrow-derived MSCs recognize damage in trabecular bone on osteoporotic rats and stimulate endochondral ossification from residual growth plates present in long bones. MSCs express the regulatory systems of PRL-PRLR and E2-E2R involved in bone progenitor cells expansion. The work shows that both regulatory systems modulate the intracellular distribution of STAT1, STAT3 and STAT5 associated to nuclear matrix. In addition, this work shows that glucocorticoids are dominant negative regulators on the presence of E2R in the nucleus of MSCs cells. These factors can be located at the microenvironment or bone niche directing signaling systems that determine the spatio-temporal location of stem cells in development or bone remodeling and repair.

# **1 INTRODUCCIÓN**

## 1.1 LAS CÉLULAS PROGENITORAS Y EL PROCESO REPARADOR DEL ESQUELETO ÓSEO DE LOS VERTEBRADOS

El esqueleto de los vertebrados está constituido por cuatro tejidos mineralizados: hueso, cartílago, dentina y esmalte pero se suelen agrupar en tejido esquelético óseo los dos primeros y dentales a los últimos. La dentina, marfil y la mayoría de los huesos del esqueleto derivan evolutivamente del dermal/dermoesqueleto de los primitivos vertebrados y del exoesqueleto. Los huesos largos derivan del cartílago primitivo de los invertebrados que dio origen en primer lugar al endoesqueleto y posteriormente al esqueleto óseo. El cartílago primitivo quedó recluido como tal tejido a pequeñas proporciones, como es el caso del cartílago hialino, en los extremos de los huesos largos del esqueleto de los mamíferos (Hall, 2005. pp 13-30). Históricamente la distinción entre cartílago y hueso fue realizada por Aristóteles (384-322 a.C) tuvimos que esperar a F. Miescher en 1836 para postular y reconocer la formación de los huesos largos como el proceso de osificación endocondral (por medio de la placa de crecimiento). Hoy existe una nueva concepción del esqueleto óseo que coincide con la de un órgano dinámico que interviene en la homeostasis de minerales, hematopoyesis y balance energético del individuo. Esto explica la curiosidad creciente de numerosos grupos científicos sobre las bases celulares y moleculares de la formación del esqueleto.

El esqueleto óseo, axial y apendicular, humano está compuesto de 206 huesos y deriva de la capa mesodérmica embrionaria lo mismo que otros tejidos como músculo, tendones y ligamentos, tejido graso, estroma dermis y otros componentes del tejido conjuntivo (Sadler, 2004. pp 181-208) El proceso de diferenciación de las células mesodérmicas en el embrión se conoce como proceso mesengénico (Caplan y Dennis, 2006). En la vida adulta, este proceso mesengénico lo llevan a cabo células progenitoras pluripotenciales mesenquimales (MSCs) aportando una continua remodelación ósea y asegurando una rápida reparación de los insultos traumáticos.

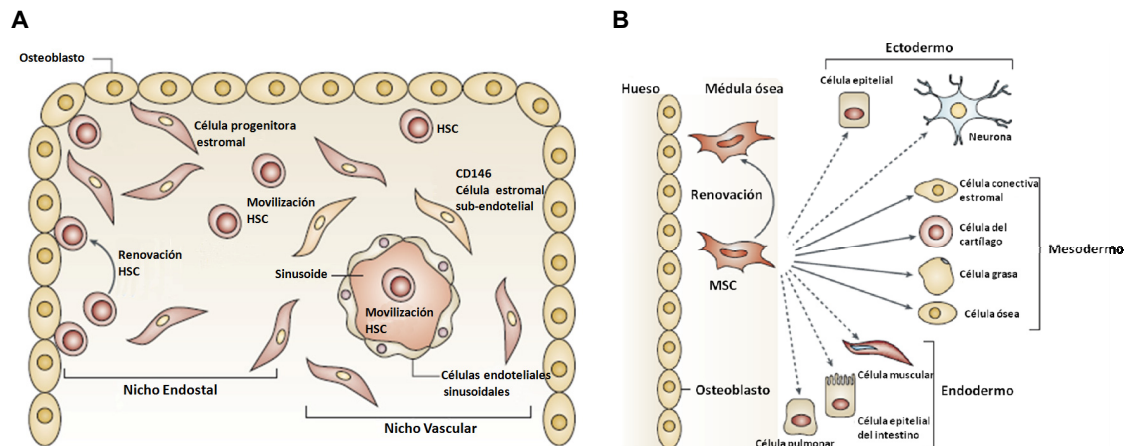
### 1.1.1 Breves antecedentes históricos

La búsqueda de las células responsables de la renovación de las células hemáticas y de la reparación de fracturas óseas la empezó Alexander Maximow, médico hematólogo ruso que lanzó la hipótesis conocida como hematopoyesis. Según ésta, todas las células hemáticas derivan de una sola embrionaria, HSC (*Hematopoietic Stem Cell*), mediante un proceso de diferenciación hematopoyético influenciado por el ambiente estromal de la médula ósea o nicho. Esta teoría fue recibida con gran escepticismo por la comunidad científica sin que ningún investigador aportara pruebas contrarias a la hipótesis planteada. Con la revolución de 1917, Maximow fue denigrado

acusándole de reaccionario junto a otros eminentes científicos como Weissman, Morgan y Vavilov. Pasados unos años Alexander Friedenstein (1924-1998) retomó el problema con una buena pregunta ¿Cómo se reparan las heridas? Estableció un modelo de cultivo *in vitro* para la capa de transición de piel de la rana. En los años 50, cambió para aprender Morfología y Microbiología para reproducir cultivos donde remitir las preguntas de hueso/hematopoyesis. Los siguientes 25 años los dedicó al efecto celular de las irradiaciones/hematopoyesis/médula ósea, Friedenstein lanzó la hipótesis de la célula estromal de la médula ósea como célula troncal, MSC, capaz de diferenciarse en los tejidos de origen mesenquimático y proporcionar el nicho para la hematopoyesis. Aisló por primera vez células adherentes de la médula ósea con morfología fibroblástica, clonogénicas, CFU-F (*Colony Forming Unit-Fibroblast*), de gran capacidad replicativa “*in vitro*” capaces de ser multipotenciales por diferenciarse en condrocitos, osteoblastos, adipocitos y dar el soporte microambiental a la hematopoyesis (Friedenstein, 1989; Tavassoli y Crosby, 1968; Tavassoli y Weiss, 1971). La visión de la médula ósea de los huesos largos como un gran reservorio de células progenitoras de los tejidos de origen mensengénico se debe a Arnol I. Caplan. Éste, además de los logros sobre el conocimiento de las MSCs, inició y defendió el interés terapéutico de la ingeniería tisular (Caplan *et al.*, 1994). Hoy nadie duda de la veracidad, importancia y relevancia de los descubrimientos de estos científicos. No obstante, los tipos exactos de células estromales que intervienen en la composición del nicho hematopoyético y los mecanismos celulares de las interacciones responsables continúan siendo un reto científico.

### **1.1.2 Actualidad. Nichos en la médula ósea. Vascularidad, inmunosupresión, reparación tisular.**

Los experimentos de terapia con células MSCs procedentes de distintos tejidos han aumentado enormemente en los últimos cinco años. Nos parece de especial interés una revisión del grupo de Uccelli (Uccelli *et al.*, 2008). Éste grupo utilizando animales NOD-SCID (*Nonobese Diabetes- Severe Combined Immunodeficiency*) ha demostrado que las células MSCs se diferencian en células de las tres capas del embrión (ver esquema 1) que conforman la celularidad del nicho hematopoyético.



Esquema 1: A- Nicho vascular y Endostal; B- Proceso de diferenciación y renovación de las MSCs.

Las células HSCs son retenidas en una situación de quiescencia hasta que reciben un estímulo apropiado, se diferencian y son liberadas al sistema sinusoide vascular. El sistema sinusoidal se encuentra formado por la célula HSC rodeada de células estromales, distinguiéndose dos tipos de nichos: el localizado en el endostio de las trabéculas y el vascular rodeando los vasos. La célula estromal que rodea los vasos proporciona los factores que inhiben la proliferación. Esta acción es la base para el efecto inmunosupresor de las células estromales del nicho (Bocelli-Tyndall *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2007; Haniffa *et al.*, 2007).

Las MSCs inhiben la maduración de los monocitos en las células dendríticas mieloides, aportando así una acción anti-inflamatoria. También inhiben la acción citotóxica de las NK (*Natural Killer*) e impiden la activación de los neutrófilos en hueso y pulmones. Igualmente se ha descrito la acción de las MSCs sobre la regulación de la inmunidad adaptativa mediada por inducción de IL-4 (Interleukina-4) en las células T-helper. Esto hace que la terapia celular con MSCs se amplíe a prácticamente todos los problemas clínicos que plantean incompatibilidad, rechazo, autoinmunidad etc. (Ucelli *et al.*, 2008; Tyndal *et al.*, 2007)

Sin embargo, llama la atención que ningún grupo haya podido observar la diferenciación ósea de las células MSCs utilizadas en los trasplantes de médula. Caplan, en una última revisión, ha sugerido que la primera función de las células MSCs para inducir el nicho adecuado de reparación de los tejidos mesenquimáticos es la inmunosupresión, y seguidamente, el establecimiento mediante factores tróficos del microambiente reparador (Caplan, 2009). Esta hipótesis ha tenido su primera evidencia con los experimentos que muestran la formación de un nicho óseo ectópico en riñón mediado por el implante de células progenitoras de hueso fetal (Chan *et al.*, 2009).

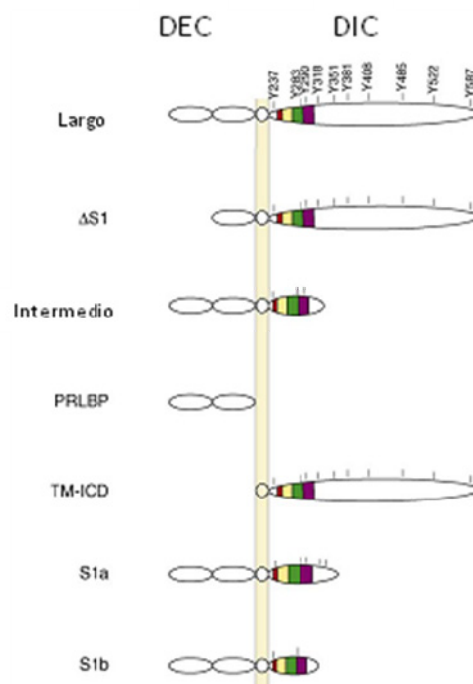
### 1.1.3 Factores tróficos producidos por las MSCs

La comunicación entre las células de un mismo tejido o de tejidos diferentes que componen los órganos presenta grandes lagunas. No sabemos cuáles son, cómo actúan, ni los mecanismos celulares y moleculares empleados en enviar los mensajes. Los factores más estudiados son los correspondientes al sistema neuroendocrino, pero los factores autocrinos, paracrinos o intracrinos que regulan la expresión génica, la especificación celular, diferenciación, migración etc., están empezando a ser estudiados, son numerosos y además cada función tiene regulación redundante por varios sistemas reguladores (Meirelles *et al.*, 2009). Nuestro grupo tiene su interés científico en establecer las bases celulares y moleculares mediante las cuales la prolactina (PRL) y su receptor regulan el esqueleto óseo y su reparación.

#### 1.1.3.1 La Prolactina y el esqueleto óseo

La hormona de la pituitaria prolactina es producida también ectópicamente por células del epitelio mamario, gónadas y por células mesenquimales de la médula ósea teniendo una acción celular proliferativa/diferenciadora y anti-apoptótica. Por su estructura y la de su receptor se agrupa dentro de la familia de citoquinas hematopoyéticas como LIF (*Leukemia inhibitory factor*), GH (*Growth Hormone*), EPO (Eritropoyetina) etc. Las acciones más estudiadas son la de regular el desarrollo y función de la glándula mamaria, hueso y también en la formación de tumores mamarios (Ogueta *et al.*, 2002; Clevenger *et al.*, 2002). No obstante se han descrito más de 100 acciones biológicas diferentes y sigue siendo un reto determinar el papel de la PRL en la formación y mantenimiento del esqueleto. Se ha demostrado que la PRL es un componente del líquido sinovial humano, su receptor se expresa en el cartílago articular (Ogueta *et al.*, 2002), y los animales KO (*Knockout*) del receptor (PRLR) presentan entre las numerosas patologías retraso en la osificación de la calvaria (Ormandy *et al.*, 1997a; Ormandy *et al.*, 1997b) y en la formación de hueso (Clement-Lacroix *et al.*, 1999).

La PRL efectúa su acción celular a través de su receptor de membrana que existe en diferentes isoformas (PRLRL, S y  $\Delta$  corresponden a largo, corto y variantes de la transcripción y/o postranscripcionales, respectivamente). (Esquema 2 recoge las isoformas del PRLR humano), (Kline *et al.*, 1999; Kline *et al.*, 2002). Mediante las isoformas cortas la PRL realiza acciones dominantes negativas o se gradúa la acción celular de los diversos tejidos (Berlanga *et al.*, 1997). La acción canónica de la PRL es mediada por la acción de las proteínas asociadas al PRLR en su dominio intracelular, (DIC).



Esquema 2: Isoformas del receptor de prolactina.

El Dominio Intracelular contiene los siguientes dominios desde la región próxima a la membrana a la región C-terminal: Box 1/región variable 1/Box 2/región variable 2/región específica C-terminal (Clevenger *et al.*, 2002). La unión de PRL a su receptor dispara la fosforilación del dominio DIC y la activación de las cascadas de señalización asociadas: Jak2-STAT5 (*Janus kinase 2- Signal transducer and activators of transcription protein*); Grb2 (*Growth factor bound protein 2*) Sos (*Son of sevenless*); Ras; Raf; MEK; MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*); Nek (*Nima related kinase*); Vav; Rac1; PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinases*); Akt (*Protein kinase B*). La PRL también induce su degradación a través de la serina 349 del dominio DIC que fosforilada asocia la actividad UBI-ligasa SCF-E3 (Skt, Cullin, F-box conteniendo el complejo E-3) en la formación del degrón. El tiempo de permanencia de la activación del receptor es específico de cada célula y es regulado por la actividad GSK3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$* ) al fosforilar la Ser-349. A su vez la GSK3 $\beta$  es regulada por la fosforilación en la Ser 9 por la vía Ras. Ésta vía inactiva a la GSK3 $\beta$  y el receptor PRLR (receptor de prolactina) permanece más tiempo activo. Los factores que evitan la activación de GSK3 $\beta$  conducen a una estabilización de la acción de la PRL (Tang *et al.*, 2005; Plotnikov *et al.*, 2009).

Mediante la proteína con actividad TyrK (*Tyrosine kinase*) Jak2, el receptor de PRL adquiere capacidad para nuevas interacciones. Jak2 es un miembro de los cuatro conocidos de la familia Jak. La homología que guardan se conoce como dominios JH (*Jak Homology domain*) y tienen siete. Empezando por la terminación C- tenemos JH1 con actividad Tyrk, JH2 es un dominio falso de actividad tyrk, JH3 es un dominio con un



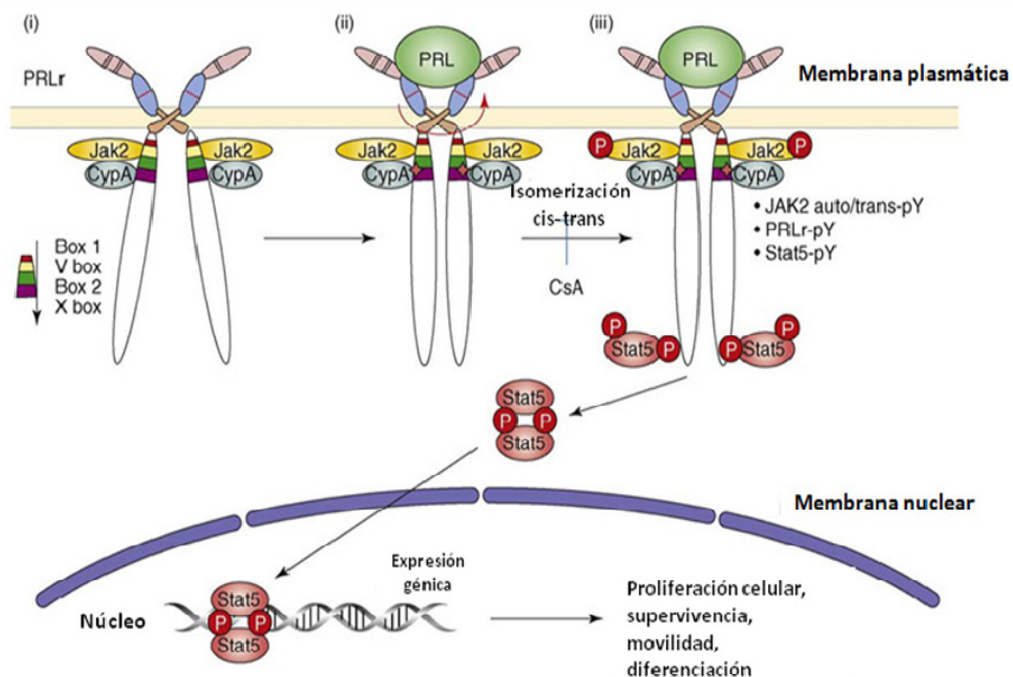
motivo SH2 y JH4-7 que tienen homología para interacciones con ezrina, radixina y moesina (ERM). Se ha demostrado que en el caso del receptor de GH la región N-terminal de Jak2 es necesaria para la interacción con GHR (*Growth Hormone Receptor*) (He *et al.*, 2003). Jak2 también juega un papel esencial en la señalización celular del PRLR ya que queda fosforilado en 30-60s mediante auto o transfosforilación de las Jak2 asociadas. La actividad de Jak2 es igualmente necesaria para GHR y su inactivación conduce a la eliminación de la señal STAT5 en los procesos de crecimiento y diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo* (Brockman *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2002).

El esquema clásico de la dimerización del receptor de PRL, GH o EPO (Eritropoyetina) fue deducido por los estudios cristalográficos del receptor soluble de GH y su ligando. Estudios posteriores mostraron que el receptor podría estar dimerizado en ausencia de ligando (Brown *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007). La función del receptor dimerizado es favorecer la unión con el ligando y transmitir una rotación al dímero en su dominio IM (Brown *et al.*, 2005; Mellado *et al.*, 1997). El receptor de EPOR (Receptor de Eritropoyetina) dimeriza tras la unión del ligando y realiza un movimiento de tijera (Seubert *et al.*, 2003). Los estudios sobre los mecanismos de homo- y heterodimerización del receptor usando diversas técnicas, como FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) o BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), no han sido concluyentes hasta que en un artículo reciente se ha demostrado que tanto el PRLR endógeno como el transfectado forman dímeros activos en ausencia de ligando (Qazi *et al.*, 2006; Gadd *et al.*, 2006). La parte que controla la acción del dímero activo sin ligando es un residuo Cys del dominio TM. Estos trabajos sugieren que la predimerización del receptor ahorra tiempo en la activación ya que mantiene sin difundir por las membranas los monómeros del PRLR.

### **1.1.3.2 Señal intracelular del PRLR mediada por la actividad peptidil-prolil isomerasa**

Peptidil-prolil isomerasas (PPIs) son una familia de proteínas con mucha importancia en la traducción de señal de muchas citoquinas. En la familia se encuentra la Ciclofilina A (CypA) que fue reconocida por ser la molécula receptora del inmunosupresor Ciclosporin A (CsA). El FKBP12, un PPI, cataliza el cambio de conformación necesario para pasar de activo a inactivo la señal de TGF- $\beta$ R (*Transforming Growth Factor-  $\beta$  Receptor*) (Lu y Zhou, 2007) y curiosamente las PPIs interaccionan con la señal STAT5 (Rycyzyn *et al.*, 2000). Se han encontrado a CypA y CypB asociadas a STAT5 y Jak2 respectivamente. Cuando PRL se une a PRLR, se potencia la acción de la CypB unida a STAT5, mediante la retirada de PIAS3 (*Protein Inhibitors of Activated STATs 3*) que reprime a STAT5 aumentando la expresión de los

genes inducibles por PRL entre los que se encuentran el receptor de estrógenos y los propios receptores de prolactina. La CypA se une a PRLR y Jak2 de manera constitutiva activa la traducción del receptor. Se ha propuesto una acción proximal y otra distal para regular la acción de la PRL mediada por Cyp y la CsA (Zheng *et al.*, 2008). Estos resultados tienen una gran relevancia para el conocimiento y el tratamiento del cáncer de mama.



Esquema 3: Cambio conformacional del receptor de prolactina

La CsA reduce la proliferación *in vivo* e *in vitro* de células de cáncer de mama, tanto que expresan el receptor de estrógenos como negativos del receptor, a unas dosis muy pequeñas (1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) y en dosis mayores puede inducir la apoptosis de las células (Zheng *et al.*, 2008). En estas condiciones se inhiben las vías Jak-STAT5, Akt y ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) pero no se detectó inhibición de la señal de Insulina o PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*). Estos resultados explican que el 90% de las mujeres que han tenido un tratamiento inmunosupresor no desarrollan cáncer. Estudios recientes muestran la existencia de una reducción en la expresión de la ciclina D1 y de la angiogénesis (Clevenger *et al.*, 2009).

#### 1.1.4 La acción celular de los estrógenos y su relación con PRL

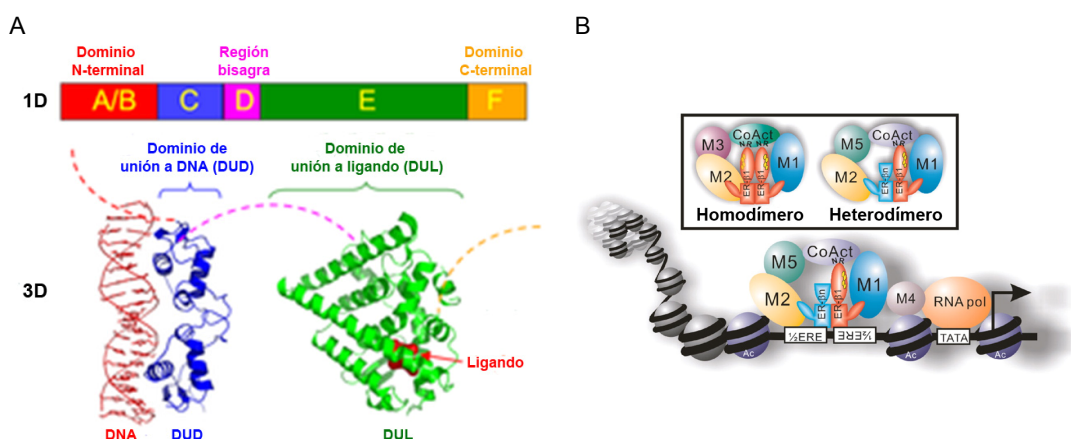
Los estrógenos disparan la acción celular mediante receptores nucleares codificados en 49 genes en el genoma humano, a los que hay que añadir 9 que tienen variables en el C-terminal que dan lugar a 13 formas variables de NR (*Nuclear Receptor*)

naturales. Tanto los estrógenos como la PRL son requeridos para el desarrollo de las glándulas mamarias y próstata y se les implica en cáncer de ambos tejidos. La PRL colabora en la proliferación inducida por los estrógenos y en la diferenciación inducida por glucocorticoides, aunque los mecanismos de la relación no son conocidos. (Arpino *et al.*, 2008; Blank *et al.*, 2008; Clevenger *et al.*, 2003a; Clevenger *et al.*, 2003b; Plotnikov *et al.*, 2009).

### 1.1.5 El receptor de estrógenos

La hormona  $17\beta$ -estradiol (E2) es una de las llaves reguladoras del crecimiento y la diferenciación y cumple funciones en una amplia gama de tejidos diana, incluyendo los tractos reproductivos masculino y femenino, glándula mamaria, esqueleto y sistema cardiovascular (Giguière *et al.*, 1998). El efecto predominante de los E2 está mediado por dos receptores intracelulares, ER $\alpha$  (Receptor de Estrógenos  $\alpha$ ) y ER $\beta$  (Receptor de Estrógenos  $\beta$ ). Estudios *in vitro* sugieren que ambos receptores juegan un papel redundante en la señalización de los E2 (Hall *et al.*, 2001).

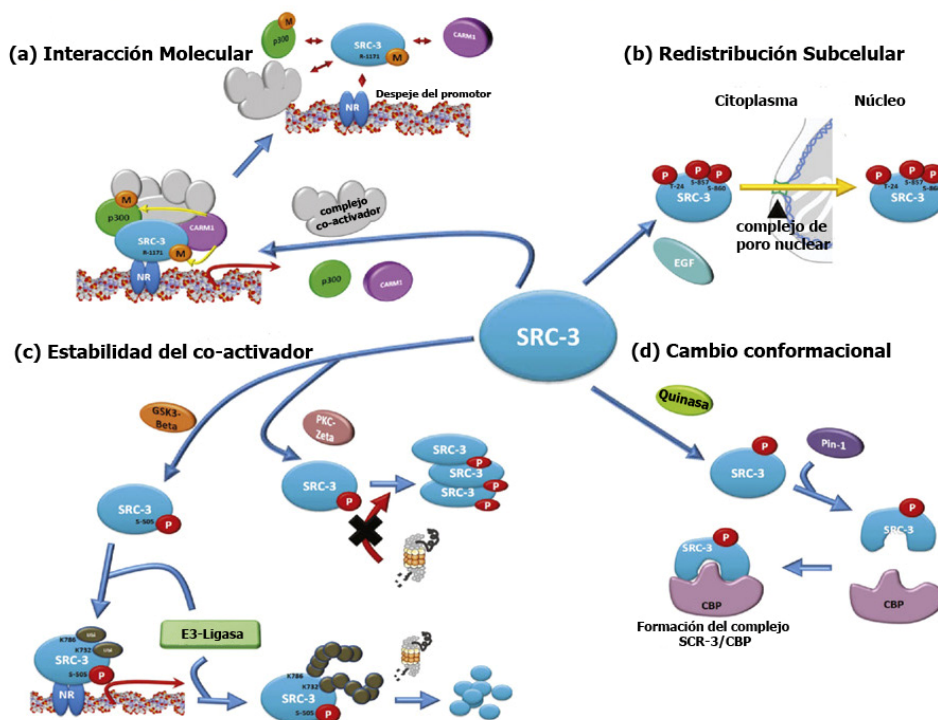
Los mecanismos de acción dependientes de ligando de los receptores de estrógenos (ER) son un elemento definido en los miembros de la Clase I de la superfamilia de receptores nucleares (NR), de los cuales ER $\alpha$  y ER $\beta$  son miembros. La actividad transcripcional dependiente de ligando de ER $\alpha$  está mediada por dos dominios de activación separados, uno de ellos constitutivo AF-1 (*Activation Function-1*) localizado en el extremo N terminal (Dominio A/B) y el otro AF-2 (*Activation Function-2*) dependiente de hormona localizado en el dominio de unión al ligando (Tora *et al.*, 1989) (Esquema 4). El dominio funcional AF-2 está muy conservado y es esencial para la actividad transcripcional dependiente de ligando y la interacción con los miembros de la familia de co-activadores SRC (*Steroid Receptor Co-activator*) (Heery *et al.*, 1997)



Esquema 4: A- Dominios funcionales de los Receptores Nucleares; B- Mecanismos de modulación génica de los NR (Receptores Nucleares)

Los sistemas reguladores NR modulan la transcripción génica mediante varios mecanismos dando cuatro grupos. De éstos los receptores de estrógenos y de glucocorticoides pertenecen al mismo grupo caracterizado por: Permanecer en el citosol unidos a proteínas de choque térmico (HSP); La presencia del ligando conduce a un cambio conformacional que resulta en la disociación del complejo con las HSP (*Heat Shock Proteins*), La exposición de las NLS (*Nuclear Localization Signal*) que le permiten reconocer los poros nucleares y ser traslocado al núcleo; Los NR forman homo o heterodímeros y se unen a la secuencia de los elementos de respuesta específicos en la región promotora de los genes diana de su acción; Y por último, agrupan las moléculas co-reguladoras que le ayudan a la remodelación de la cromatina y en la regulación positiva o negativa de la transcripción (Smirnov, 2002).

Los co-activadores de receptores nucleares son reclutados al DNA mediante los NR, potenciando la transcripción de genes dependientes de NR. Para obtener la complejidad de regulación de genes mediados por NR con un número finito de co-activadores, las propiedades moleculares de los co-activadores son moduladas dinámicamente mediante modificaciones post-traslacionales (PMTs) en respuesta a estímulos externos. Las modificaciones post-traslacionales pueden regular las interacciones moleculares de los co-activadores con factores de transcripción y otros co-activadores, así como la estabilidad de proteínas y su estado conformacional y actividad enzimática (esquema 5) (Han *et al.*, 2009).

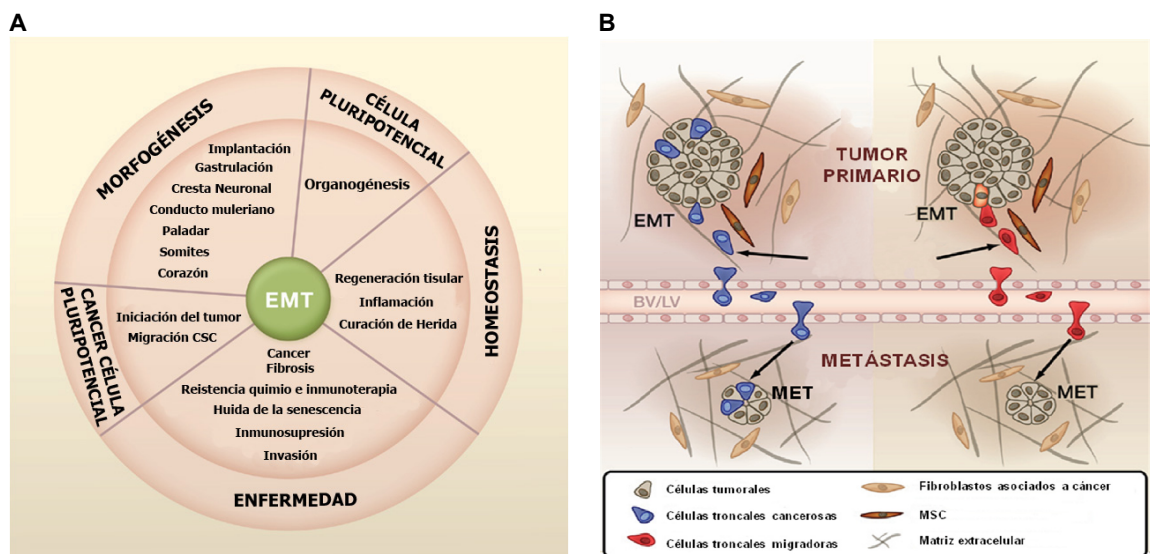


Esquema 5: A-Dominios funcionales de los receptores nucleares; B-Mecanismos de modulación génica de los NR (Receptores nucleares)

### 1.1.5.1 Los estrógenos y la PRL en la transición epitelio-mesénquima.

La mayoría de los tejidos y órganos adultos surgen de una serie de conversiones de células epiteliales a células mesenquimales, a través de la transición epitelio mesénquima (EMT) y el proceso reversible (transición mesénquima-epitelio, MET). La conversión de células epiteliales a células mesenquimales es fundamental en el desarrollo embrionario y da lugar a una serie de cambios fenotípicos en los que se incluye la pérdida de adhesión célula a célula, la pérdida de la polaridad celular y la adquisición de propiedades invasivas y migratorias.

La transición epitelio-mesénquima juega un papel importante en el desarrollo del organismo y en la diferenciación de múltiples tejidos y órganos. Así mismo contribuye a la reparación de tejidos, pero también puede ser causa de fibrosis en distintos órganos y promueve la progresión de tumores y metástasis. EMT dota a las células de unas propiedades migratorias e invasivas, previene la apoptosis y senescencia y contribuye a la inmunosupresión (Thiery *et al.*, 2009) (Esquema 6).



Esquema 6: A- La Transición Epitelio Mesénquima (EMT) participa en múltiples procesos celulares; B- EMT juega un papel fundamental en la progresión del tumor y la metástasis.

Esta interrelación de epitelio y mesénquima se ha descrito en las fases del desarrollo del cartílago (Hall, 2005, pp.243-255). Recientes evidencias sugieren que las células que se someten a la EMT adquieren propiedades de células troncales. Aunque quedan análisis por realizar es necesario determinar si EMT está caracterizado por la producción de células troncales normales. A tenor de que en el nicho endostal encontramos como factores endógenos interrelaciones célula-célula; célula-matriz extracelular; célula-vasos; y por los cambios celulares existentes, se puede sugerir la existencia de una relación epitelio/endotelio-mesénquima.

Las células troncales normales y cancerosas pueden adquirir un fenotipo mesenquimal que mejora su capacidad de preservar la troncalidad, retener las propiedades migratorias y responder a diferentes estímulos durante la expansión y diferenciación.

Los estrógenos son factores reguladores importantes en la interacción/diálogo (*cross-talk*) de la transición epitelio-mesénquima, actuando como morfógenos en la ramificación de los alveolos mamarios, pulmonares y próstata (Alonso-Magdalena *et al.*, 2009). La acción celular no canónica de los estrógenos tiene al parecer mucha implicación en su función morfogénica y en la formación de tumores (Hall *et al.*, 2001). La pérdida de E-Cadherina se produce mediada por la represión de los E-box por Snail, Slug, SIP1 (*Survival of motor neuron protein Interacting Protein 1*) y Twist. Snail es reprimido por MTA3 (*Metastasis Associated protein 3*) regulado por los estrógenos (Dhasarathy *et al.*, 2007; Alonso-Magdalena *et al.*, 2009).

Si se tiene en consideración que: primero, se conoce la implicación del déficit de estrógenos como causa primera de osteoporosis (Couse y Korach, 1999). Segundo, se conoce el efecto de la prolactina en el desarrollo del hueso (Ormandy *et al.*, 1997a; Ormandy *et al.*, 1997b; Clement-Lacroix *et al.*, 1999), así como su presencia en el líquido sinovial (Ogueta *et al.*, 2002). Tercero, se conoce la síntesis de estrógenos y prolactina en las células MSCs (Arpino *et al.*, 2008; Blank *et al.*, 2008; Clevenger *et al.*, 2003a; Clevenger *et al.*, 2003b; Plotnikov *et al.*, 2009). En el presente trabajo analizamos el efecto de la administración de células MSCs en un modelo experimental de rata con osteoporosis tras OVX, así como analizar las bases celulares y moleculares de las MSCs. Por lo que se estudia la posible relación entre los sistemas reguladores formados por PRL y E2 y sus respectivos receptores y la implicación de ambas hormonas en la vía Jak-STAT en las células progenitoras de hueso.

## **2 OBJETIVOS**

La osteoporosis es la enfermedad degenerativa mayoritaria del esqueleto óseo de mayor incidencia en la especie humana. ¿Sería posible recomendar una terapia celular en la osteoporosis?. ¿Qué modelo animal utilizar?. ¿Cómo obtener las células progenitoras?. ¿Cómo una célula progenitora realiza la diferenciación osteocondral?. ¿Cómo se regula?

1. Desarrollar un modelo de animal osteoporótico. Valorar la pérdida de masa ósea mediante radiografía. Aislar células mesenquimales de médula ósea de animal macho para trasplantar a hembras. Puesta a punto la determinación del cromosoma Y mediante hibridación "*in situ*". Realizar los experimentos en grupos para valorar el modelo experimental, cirugía y acción del trasplante de células. Valorar los posibles cambios en el hueso trabecular del fémur.

2. Aislar células mesenquimales de médula ósea de donantes sanos. Estudiar la acción de la PRL y E2 en la proliferación/diferenciación de las MSCs. Determinar la presencia de la vía Jak-STAT en las células progenitoras.



# **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1 ANIMALES Y CULTIVOS PRIMARIOS

Los animales utilizados fueron ratas Sprague Dawley (SD) criados y mantenidos durante su estabulación en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Las condiciones de estabulación fueron de 12 horas de luz y oscuridad a 20-22 °C de temperatura con comida y bebida disponible *ad libitum*. Las condiciones de estabulación responden a las Directrices 609 CEE, RD 223/88 del 14 de Marzo B.O.E. sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

#### 3.1.1 Aislamiento y cultivo de células MSCs de médula ósea.

La médula ósea fue extraída del fémur de ratas machos insuflando PBS estéril con la ayuda de una jeringa. El procedimiento seguido para aislar las rMSCs, descrito por Lennon (Lennon *et al.*, 1996), se realizó sembrando 200.000 células/cm<sup>2</sup> en DMEM-LG (*Dulbeccos's Modified Eagle medium- low glucose*, con un 1g/l de glucosa), suplementado con FBS al 10% y se seleccionó por su capacidad de adhesión al plástico. Tras 10 días desde la siembra los clones fueron observados y en 2-3 semanas se realizó el primer pase. Las células empleadas en los trasplantes se utilizaron después de 4 pases.

Las células MSCs humanas se aislaron a partir de 2-3 ml de médula ósea de donantes sanos. Las muestras fueron facilitadas por el Dr. Rañada del Hospital Universitario "La Princesa". Las células se aislaron en gradiente de Percoll y se seleccionaron por su adhesión al plástico y formación de clones (Lennon *et al.*, 1996). Las células se cultivaron en medio, suplementado con FBS al 10% de lotes seleccionados, glutamina 2 mM, estreptomycin 0,01 %, penicilina G 0,06 % y se incubaron a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y un 97% de humedad relativa. El medio se cambió dos veces por semana y los pases se realizaron cuando las células alcanzan el 80-90% de confluencia.

#### 3.1.2 Modelo murino de osteoporosis

Las ratas SD se utilizaron para aislar y cultivar células MSCs de la médula ósea y para realizar experimentos de terapia celular en un modelo murino de osteoporosis. Éste se consiguió realizando ovariectomía (OVX) bilateral en ratas SD de tres meses y manteniendo el peso inicial de 280-320 g mediante ajuste calórico de la alimentación según las indicaciones del protocolo descrito por Fernandez-Galaz (Fernandez-Galaz *et al.* 2002). El procedimiento de restricción calórica evita que la leptina, producida por el

tejido adiposo, pudiera interferir en el modelo de osteoporosis (Ducy *et al.*, 2000; Karsenty, 2006a; Karsenty, 2006b). La densidad ósea determinada irradiando los animales OVX con rayos X marcó la implantación de la osteoporosis. Las radiografía se realizó en el aparato Rayos X, marca Hewlett Packard modelo Cabinet X-Ray system, n° 43855A, Faxitrón utilizando placas radiográficas marca Kodak X-OMAT MA film (18X22,4). Las condiciones de estudio radiológico fueron: distancia foco placa constante de todos los animales de 20 cm; intensidad de 1,5 mA/seg; voltage de 30 Kv; tiempo de exposición 18 segundos.

### 3.2 TRASPLANTES DE MSC.

Los animales se utilizaron en grupos compuestos de un mínimo de seis individuos de la misma edad y sexo. El modelo murino de osteoporosis se consiguió a partir de 18-20 animales SD hembras maduras sexualmente. Del grupo, 12-14 animales se sometieron a ovariectomía (OVX) y todos los individuos, OVX (12) y controles (6), recibieron una dieta testada para mantener el peso de los animales (Fernandez-Galaz *et al.*, 2002).

Los animales OVX (12) se dividieron en dos grupos y los individuos de uno de los grupos recibieron un trasplante de células por la vena caudal con solución salina. Las células MSCs se usaron procedentes de machos de la misma estirpe de ratas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ 0,5 de PBS ml, grupo OVX+MSCs (grupo 3). Las ratas controles de OVX (grupo 2) y de edad (grupo 1) recibieron 0.5 ml de solución salina. Después de 6 semanas, 18 semanas y 6 meses post-trasplante celular se finalizó el ensayo y se realizó la eutanasia de 6 ratas de cada grupo mediante CO<sub>2</sub> para su estudio. Los animales fueron pesados al inicio y al final de los experimentos y los animales se mantuvieron entre los 270-360 g. El resultado efectivo de la ovariectomía se confirmó por la ausencia de tejido ovárico y la atrofia del útero mediante una inspección durante la autopsia. Se tomaron muestras de distintos tejidos, riñón, hígado, timo y carcas para anatomía patológica. La parte distal del fémur se extrajo, se fijó en formalina al 4% y se destinó para análisis histológico. Se siguieron las Guías de la Unión Europea a cerca del uso de animales para la experimentación.

### 3.3 HISTOMETRÍA DE LA PLACA DE CRECIMIENTO

Las muestras correspondientes a las epífisis distal del fémur, que habían sido fijadas en formalina al 4%, se sometieron a un tratamiento de decalcificado durante 3 semanas en ácido etilendiaminotetracético al 10 % (EDTA, pH 8.0) y posteriormente se tallaron seccionado en plano sagital. Las piezas se embebieron posteriormente en

parafina y se practicaron cortes sagitales seriados de 4  $\mu\text{m}$ , montados en portas simples para tinciones con Hematoxilina y Eosina (HE) y xilanizados para las tinciones de inmunohistoquímica. El colágeno tipo II se determinó mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal (dilución 1:10) de Oncogene Research. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio Carl Zeiss, Axiolab, con cámara MC 80DX.

Técnica de Histometría: Todas las medidas histológicas se realizaron en la región central de la placa de crecimiento con la ayuda de una pieza ocular micrométrica con un aumento de 40 X. La altura de la placa de crecimiento se define como la media de 5 medidas, tomadas perpendicularmente sobre el límite superior de la zona germinativa al límite más bajo de la zona hipertrófica.

### 3.3.1 Estereología de las trabéculas epifisarias y metafisarias en la región distal del fémur.

Para el estudio estereológico de trabéculas epifisarias, metafisarias centrales y metafisarias marginales de las cortes seriados y teñidos con HE, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros y utilizando la plantilla de Merz (ver anexo) (Parfitt *et al*, 1987): **L<sub>T</sub>**- Longitud de la trabécula; **MTW**- Anchura de la trabécula; **MMCL**- Distancia intra-trabecular

### 3.3.2 Estereología de la celularidad de osteocitos, condrocitos y clastos.

En el estudio estereológico de la celularidad de osteocitos, condrocitos y clastos se han tenido en cuenta los siguientes parámetros utilizando la plantilla de Gundersen (ver anexo), (Gundersen *et al.*, 1988): **Nv**- Densidad numérica, celularidad o número de células por unidad de volumen ( $\text{mm}^3$ ); **Frv**- Densidad celular, fracción de volumen celular o volumen que ocupan las células en la estructura; **Vc**- Volumen celular medio. Estas tres variables se han utilizado para medir la celularidad en diferentes regiones del hueso:

- **Osteocitos en las trabéculas:** se han tenido en cuenta las trabéculas epifisarias, trabéculas metafisarias centrales y trabéculas metafisarias marginales.
- **Osteocitos en el hueso:** se han tenido en cuenta el hueso cortical, el periostio y el hueso supraplaca. El hueso supraplaca no se encuentra descrito en la bibliografía, pero consideramos en nuestro laboratorio que es una zona objeto de estudio debido a que las condiciones biomecánicas son distintas a la cortical debido a las distintas orientaciones de las trabéculas.

- **Condrocitos en la placa de crecimiento:** Zona Germinativa, Zona Proliferativa y Zona Hipertrófica.
- **Clastos en placa de crecimiento:** Los osteoclastos expresan TRAP (*Tartrate resistant Acid Phosphatase*) y esta enzima puede ser identificada en estas células mediante un método de tinción histoquímica incluyendo en solución de acetato, naptol AS-BI ácido fosfórico, tartrato y fast garnet GBC salt (Sigma diagnostics). Esta solución fue previamente filtrada. Las preparaciones fueron incubadas en la solución durante 1 hora a 37 °C y luego fueron lavadas con agua. Posteriormente se contratiñó con Hematoxilina.

### 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la histometría de la placa de crecimiento, todos los resultados se expresaron con la  $\bar{x} \pm SD$  (Desviación Estandar). La diferencia entre grupos (OVX y OVX + rMSC con respecto al grupo control) se determinó mediante el test de la t de Student, considerando  $p < 0,05$  estadísticamente significativo.

Se utilizaron las pruebas no paramétricas para el análisis estereológico de las trabéculas y de la celularidad, para realizar comparaciones donde la variable continua no sigue una distribución normal. La comparación de los pares de muestras independientes de la media de los grupos se realizó usando el test U Mann-Whitney.

### 3.5 HIBRIDACIÓN “IN SITU” DEL GEN SRY.

La hibridación *in situ* del gen *sry* (*sex determining región Y*) se realizó en frotis de células extraídas de la médula ósea con PBS 2 mM de EGTA. Los frotis se hicieron utilizando portas xilanizados y se desproteinizaron por tratamiento con 100  $\mu$ l de Pepsina (100  $\mu$ g/ml) durante 10 min a 37° C.

La sonda del cromosoma Y marcada con Digoxigenina (*sry*-DIG) se obtuvo mediante PCR siguiendo las recomendaciones de PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche). Se utilizaron como oligos específicos del gen *sry* de rata (Invitrogen): rsry-1 (5' a 3') GGA GAG AGG CAC AAG TTG GC y rsry-2 (5' a 3') CTT CAG TCT CTG CGC CTC CT con una temperatura de renaturalización de 60°C durante 30 ciclos para obtener una sonda de 135 pb (Tashiro, 1994), y como molde de DNA, se utilizó DNA de rata macho purificado por el método de fenol-cloroformo.

La hibridación *in situ* del gen *sry* se realizó bien sobre frotis de médula ósea o en cortes histológicos de la zona distal del femur incluidos estos últimos en parafina. Todas

éstas muestras estaban recogidas sobre portas xilanizados. Después de desparafinar, se digirió con Proteinasa K (100µg/ml), se fijó con formaldehído 0,4 %, se lavó con agua y se dejó secar 5 minutos al aire. Después se colocó sobre cada muestra 50 µl de cocktail de hibridación (Denhardt's al 2%, Sulfato dextrano al 5%, esperma de salmón de 200 mg/ml, SSC 4x, Formamida al 50% y sonda-DIG 1ng/µl) colocando un cubre encima. La desnaturalización se realizó a 95 °C durante 6 minutos y posteriormente se enfrió en hielo. La hibridación se realizó en una cámara húmeda a 42 °C durante 16 horas. Posteriormente se realizaron los lavados con SSC 2x (NaCl 150mM, Citrato Sódico 15 mM pH 7,0) a 20 °C y SSC 0,1x a 42°C. La Digoxigenina se detectó mediante fluorescencia con Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection de Roche junto con Dapi. La visualización se realizó mediante el microscopio Axiovert 200 (Zeiss) acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

Los oligos *sry* fueron igualmente utilizados para amplificar el fragmento anteriormente citado de 135 pb correspondiente al gen *sry* por PCR (Tashiro, 1994). El fragmento se purificó en geles de agarosa, se aisló y se utilizó para obtener una sonda radiactiva mediante su adecuado marcaje con [ $^{32}$ P] ATP con el método de oligo de cadena sencilla. Los oligos "sentido" se incubaron a 37°C durante una hora en Tampón PNK 1x (Polinucleótido kinasa), Oligo (20ng), [ $^{32}$ P] ATP (3µci/pmol de oligo), PNK al 5 % T4 de Promega. Posteriormente se hibridaron con los oligos "antisentido" en frío con EDTA 0,5 mM añadiendo a la reacción NaCl 5M y Tris 1M pH 7,5 incubando 2 minutos a 92 °C y seguidamente 30 minutos a 37 °C.

Los DNA de las muestras de médula ósea de los animales trasplantados fueron aislados por el método de fenol-cloroformo para realizar posteriormente una PCR para amplificar el fragmento *sry*. Con los productos de la PCR se realizó un Southern en el cual inicialmente se digirió el DNA con una enzima de restricción, se separaron los fragmentos mediante una electroforesis en agarosa, se desnaturalizó el DNA en el gel con solución alcalina (NaOH), se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon, se pre-hibridó en presencia de DNA de salmón y posteriormente se hibridó con  $^{32}$ P-*sry*. Finalmente, se realizó una autorradiografía con películas Kodak X-Omat. Las muestras tuvieron como control negativo DNA de células de médula de rata hembra, y como control positivo el correspondiente a macho y una muestra de fragmento purificado *sry*.

### 3.6 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

La proliferación se estimó por la incorporación de [ $^3$ H]-timidina en hMSCs y determinación de Ki67 mediante inmunocitoquímica.

Incorporación de [ $^3$ H]-timidina: Las células ( $1,5 \times 10^4$ ) se sembraron en placas de cultivo M24 y se cultivaron con DMEM-LG suplementado con FBS al 10% durante 16 h.

Trascurrido el tiempo, las células se pusieron en ayunas de suero durante las siguientes 48 h con las hormonas PRL (40 ng/ml), E2 (10, 20 y 40 nM) y Dexametasona (0.1µM) (Dex) y durante las últimas 8 h fueron expuestas a 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina. La acción de la PRL y E2 sobre la proliferación se determinó mediante la adición de diferentes concentraciones de 17 β-estradiol y comparando su acción en presencia de concentraciones constantes de PRL. El crecimiento celular en FBS al 10% es el control positivo. Cada tratamiento se ensayó por triplicado y la radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido. Los resultados son la media ± SEM (Desviación estándar) de tres experimentos y se han expresado en % de incorporación respecto del control.

Determinación de Ki67 mediante inmunocitoquímica: Las células ( $1,5 \times 10^4$ ) se sembraron en cubres tapizados con 0.5% gelatina en PBS dispuestos en placas de cultivo M24 y se cultivaron con DMEM-LG suplementado con 10% de FBS durante 16 h. Trascurrido el tiempo, las células se pusieron en ayunas de suero durante las siguientes 72 horas y se trataron con las hormonas PRL (40 ng/ml) y E2 (40 nM) en presencia de distintos inhibidores agonistas o antagonistas: ICI (100 nM, Tocris bioscience), Estren (10 nM Steraloids Inc), PHTPP (100 nM, Tocris bioscience) y LiCl (10mM). Trascurrido el tiempo del tratamiento las células se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS 1X durante 30 minutos, se trataron con NH<sub>4</sub>Cl 50mM para reducir la autofluorescencia durante 10 minutos y se permeabilizó con Tampón CSK (NaCl 5M, Pipes 1M, MgCl<sub>2</sub> 1M) durante 30 minutos para eliminar todas las proteínas citosólicas. Posteriormente se volvió a fijar con formaldehído al 3,7% durante 10 minutos y se bloqueó durante 1 hora con PBSA 1% (PBS 1x + BSA 1%) y se lavó con PBSA 0,1% (PBS 1x + BSA 0,1%). Se incubó durante 1h con Ki67 (NeoMarkers, 1:200) en PBSA 0,1% y transcurrido el tiempo se lavó con PBSA 0,1%. Las muestras se incubaron durante 45 minutos en oscuridad con DAPI (Calbiochem, 1µg/ml) y el anticuerpo secundario Goat α-Rb555 (Invitrogen, 1:500). Finalmente las preparaciones se lavaron con PBSA 0,1%, se sumergieron en etanol 70%, se dejaron secar y se montaron con Mowiol/Dabco (Calbiochem). Cada tratamiento fue ensayado por triplicado. La visualización de las preparaciones se llevó a cabo en el microscopio invertido IX81 Olympus con una cámara DP72 digital. Se contaron en 10 campos a 400x un total de 300 células por cristal.

### 3.7 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN OSTEOCONDRALE

Los ensayos de diferenciación ósteocondral de las células MSCs se llevaron a cabo sembrando ( $1,5 \times 10^4$ ) en cubres tapizados por una capa de gelatina al 0,5% en PBS y dispuestos en un placa de cultivo M24. Las células se incubaron con medio de diferenciación compuesto por DMEM-LG, ITS (insulina 6,25 µg/ml, transferrina 6,25 µg/ml, ácido selenioso 6,25 ng/ml), glutamina 2 mM, albúmina 1,25 mg/ml, ácido linoleico 5,35 µg/ml, Piruvato 1mM, aminoácidos no esenciales 400 µM, ácido ascórbico 40 µg/ml,

estreptomycin 0,01 % y penicilina G 0,06 %. Los factores hormonales ensayados por su posible efecto en la diferenciación osteocondral han sido PRL, (P) a 40 ng/ml, dexametasona (D) a 0,1 mM y E2 (E) en concentraciones variables como se indica en el apartado de *Resultados*. Los ensayos de diferenciación se mantuvieron siete días con dos cambios de medio. Transcurrido el tiempo las células se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS durante 15 minutos y posteriormente se lavaron tres veces con PBS. Las muestras se mantuvieron en PBS a 4° C durante un tiempo no superior a una semana.

### 3.8 INMUNOFLORESCENCIA Y MICROSCOPIA DIGITAL.

Las células diferenciadas en cubres tapizados con gelatina se usaron para analizar el efecto de PRL, E2 y Dex en la señalización mediada por las STATs y el Receptor de E2. Con esta finalidad las muestras fueron procesadas como se ha descrito previamente (Javed *et al.*, 2000), con algunas modificaciones (Romero-Prado *et al.*, 2006). Las muestras se trataron con NH<sub>4</sub>Cl 50 mM pH 8 durante 10 min para reducir la autofluorescencia y posteriormente se eliminaron las proteínas citosólicas tratándolas durante dos periodos de 15 min con 0.5% de Triton X-100 en un tampón compuesto de Pipes 10 mM pH 6,8, NaCl 100 mM, sacarosa 0,3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y EGTA 1mM. El citoesqueleto se retiró lavando las preparaciones con NP-40 al 1% y deoxicolato al 0.5% en el tampón anterior. Los filamentos intermedios se retiraron mediante tratamiento con imidazol 0,3 mM en H<sub>2</sub>O. Las proteínas presentes en los speckles de la matriz nuclear se analizaron tras eliminar el DNA de las preparaciones. Con esta finalidad, la cromatina se digirió con DNasa I (libre de RNasa) durante dos periodos de 30 min en un tampón compuesto por Pipes 10 mM pH 6.8, NaCl 50 mM, sacarosa 0,3 M, MgCl 3 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 0,5%. Las uniones inespecíficas de proteínas se eliminaron con lavados en soluciones crecientes de NaCl hasta una concentración de 1,5 M. Posteriormente, la matriz nuclear fue fijada con 4% formaldehído y bloqueada con PBS-3% BSA. La presencia de las proteínas STATs y ER en los speckles fue valorada mediante inmunofluorescencia. Los anticuerpos usados fueron: Receptor de estrógenos (Ab-10) (1:200, NeoMarkers), STAT1, STAT3 y STAT5 (1:200, Santa Cruz). Los anticuerpos secundarios fueron Alexa 594 goat anti-mouse o Alexa 488 goat anti-rabbit (1:500, Molecular Probes). La visualización de las preparaciones se llevó a cabo con el microscopio invertido IX81 Olympus con DP72 cámara digital.

### 3.9 RT-PCR.

La obtención del RNA de las células se realizó por el método clásico de Fenol-m-Cresol, utilizando como mínimo 1 x 10<sup>6</sup> células y retirando el DNA por tratamiento con LiCl 2 M (Ogueta *et al.*, 2002). Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se



realizó mediante la reacción de retrotranscripción (RT). Se incubó 2,5 µg de RNA total con dNTP 500 nM, cebador 250 ng/ml (Invitrogen), DTT 10 mM, y 200 unidades de retrotranscriptasa (Invitrogen) en un volumen final de 20µl. La RT se llevó a cabo en una solución que contenía Tris- HCL 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM. La reacción se incubó 5 min a 65° C, 52 min a 42° C, y 15 min a 70° C. Para cada ensayo de PCR se utilizó 1 µl de cDNA en la reacción de retrotranscripción y se incubó con 6,25 picomoles de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 200 µM de dNTPs y 0,5 unidades de DNA polimerasa (Biotools), en una solución compuesta por Tris HCl 75 mM, pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 50 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM y DMSO 5%, en un volumen final de 25 µl.

Los productos de la reacción se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE (Tris borato 18 mM, y EDTA 0,4 mM) y se visualizaron intercalando Bromuro de Etidio e irradiando con luz ultravioleta. Todas las reacciones incluyeron un control negativo carente de cDNA procedente de la RT y con el resto de los reactivos necesarios en la PCR.

Los oligonucleótidos específicos utilizados han sido seleccionados mediante el programa Amplify y son los siguientes:

Fragmento	Secuencia 5'→3'	pb	T <sup>a</sup> Renat.	Nº ciclos
β-actina:	Sen: GCATGGAGTCCTGTGGCATCCACG Antis: GGGTGTAACGCAACTAAGTCATG	354 pb	60° C.	25
hREα	Sen: GAAGTGGGAATGATGAAAGGTG Antis: GCCAGACGAGACCAATCATCAG	543 pb	52° C.	40
hREβ	Sen: CTGAATCTGACGCTCAGCAG Antis: CGGGTGACAAAATCCAGACT	163 pb	63° C	40
hArom	Sen: CGGCAGCAAACCTTGGGCTGC Antis: CAGGCCGGGGCCTGACAGAG	126 pb	47° C	40
hIhh	Sen: GAGGAGTCCCTGCATTATGA Antis: CAGGAAAATGAGCACATCGC	320 pb	54° C	40
hSmo	Sen: CAGGACATGCACAGCTACATCG Antis: CCACAAAGAAGCACGCATTGAC	174 pb	53° C.	35
hPtc	Sen: TTTGGACTGCTTCTGGGAAGGG Antis: TTTTGTGGGGGCTGTGGC	243 pb	65° C	35
hPRL	Sen: CATAACAACAGCTGCCACACTT Antis: AATGGATGTGGGCTTAGCAG	452 pb	63° C	40
hRPRL (L)	Sen: CATGGATACTGGAGTGCATGGAG Antis: AAGGAGTGTGAAAACATGCGGG	1231 pb	54° C	40

### 3.10 ENSAYOS DE CO-CULTIVOS 3D

Los ensayos de co-cultivos se realizaron con dos elementos: 1º- Epífisis-metáfisis proximal extraídas de un total de 24 ratas de 9 días de edad del laboratorio de la Facultad de Medicina de la UAM. 2º- Células rMSCs extraídas de médula ósea. En todos los grupos de ensayo se realizaron intervenciones extrayendo la epífisis más metáfisis proximal de las tibias, manteniendo el pericondrio y eliminando los tejidos musculares.

Para analizar la interacción de las células rMSCs con los especímenes extraídos de las ratas, inicialmente, las células rMSCs se sembraron en el fondo de las placas de cultivo M6, previamente tapizados con gelatina al 0,5 % en PBS, a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pocillo, 24 horas antes del inicio del ensayo. Todos los especímenes se cultivaron encima de la superficie de la placa de cultivo M6, en presencia o no de las células, mediante un inserto de 0,4  $\mu\text{m}$  de poro (6-Well Millicell) A todos los pocillos se les añadió medio DMEM 4,5 g/l de glucosa y el resto de los componentes del medio de diferenciación osteocondral con la presencia o no de dos factores hormonales: PRL 40 ng/ml y/o E2 1ng/ $\mu\text{l}$ .

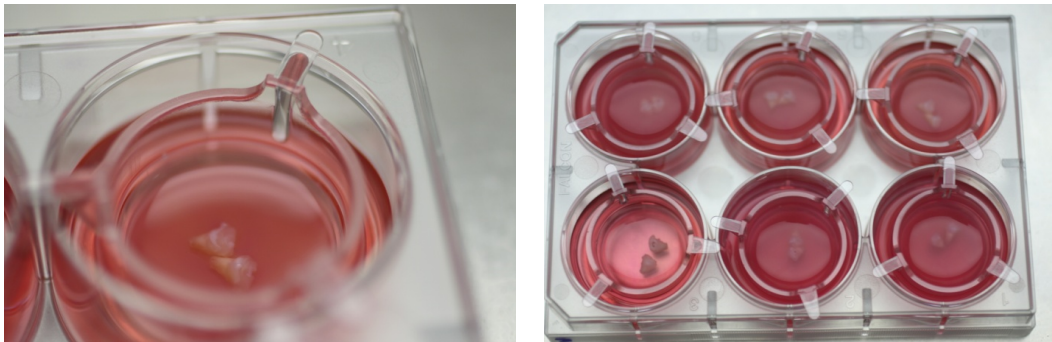


Figura 1: Co-cultivo de rMSCs con tibias (epífisis+metáfisis) con inserto.

Todos los grupos de co-cultivos se mantuvieron en un incubador con 5% de  $\text{CO}_2$  durante una semana independientemente del tipo de tratamiento (Figura 1). Tras el final del periodo de cultivo las muestras de tejido se fijaron con tampón formalina al 7% durante 2 horas. Posteriormente se introdujeron en ácido fórmico al 4 % durante 24 h verificando su correcta descalcificación. Las piezas se tallaron y se lavaron en agua desionizada y se deshidrataron en etanol de concentraciones crecientes, 70°, 96° y 100, terminando en acetato de butilo. La inclusión en parafina se realizó en la estufa de cultivo a 60 °C, en tres pasos durante un periodo total de 2 horas realizando a continuación cortes seriados de 7  $\mu\text{m}$ , montados en portas para su posterior tinción con Hematoxilina

y Eosina (HE), Rojo Sirio (colágeno) y Safranina (mucopolisacáridos ácidos) (Bancroft y Cook, 1994).

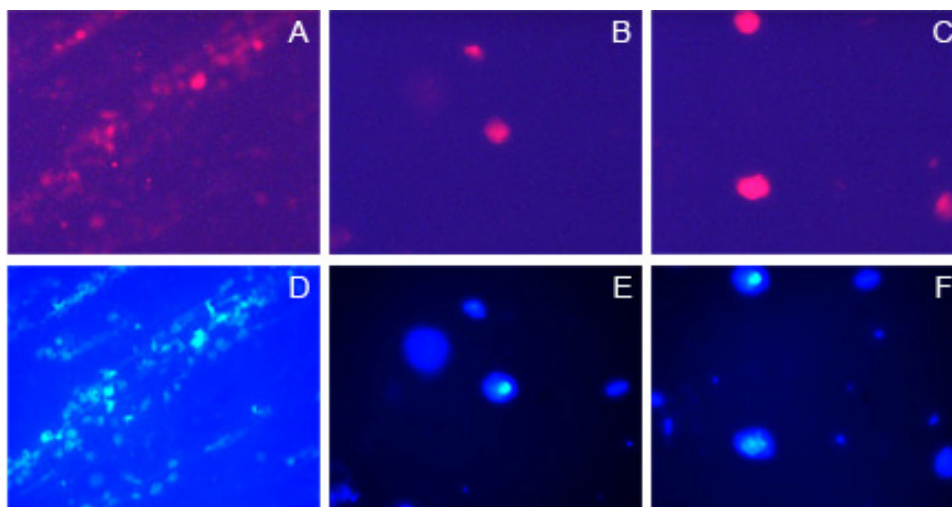
La lectura histológica se realizó en los márgenes de la placa de crecimiento debido a que hay diferentes regiones de la placa con una variabilidad de crecimiento desde la región central a la marginal, la zona proliferativa de la región marginal es más activa teniendo más células por columna que la zona proliferativa de la región central (Miralles–Flores y Delgado-Baeza, 1990; Lazowski *et al.*, 1994). La observación se realizó con un microscopio óptico añadiendo una lente polarizada, para valorar la birrefringencia emitida por las fibras de colágeno tipo I, II y III y otras proteínas no específicas.

# **4 RESULTADOS**

## 4.1 MODELO ANIMAL DE OSTEOPOROSIS

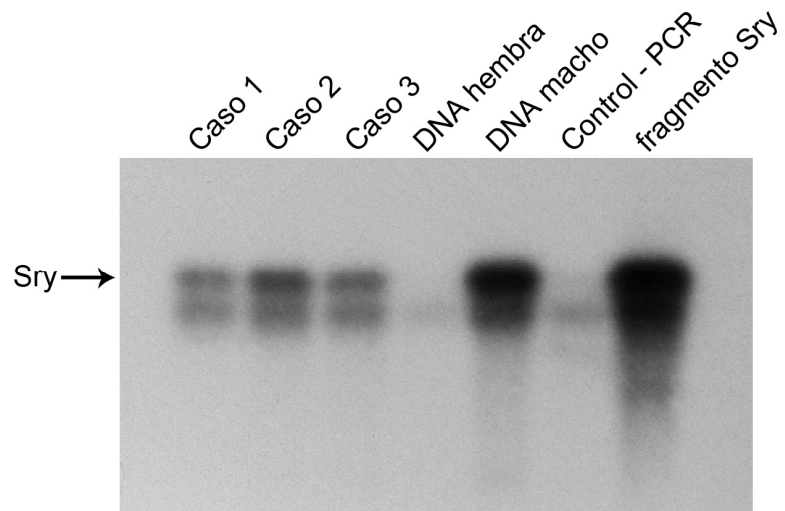
### 4.1.1 Aproximaciones experimentales previas.

Con objeto de determinar el destino de la células trasplantadas se diseñaron experimentos de trasplante utilizando células MSCs de macho para aceptores hembras y se determinó la presencia del gen *sry* del cromosoma Y. Se valoró la presencia de las células donadas a diferentes tiempos post-trasplante en frotis de la médula ósea y cortes de histológicos de la epífisis de la zona distal del fémur. Los resultados de la Fig. 2 muestran un ejemplo de hibridación del gen *sry*. El marcaje en rojo denota la presencia de células macho en la médula de los animales trasplantados con MSCs durante 2-3 semanas. Sin embargo, los análisis realizados a tiempos superiores de tres y seis meses fueron infructuosos al igual que las hibridaciones *in situ* realizadas en secciones de la placa de crecimiento del fémur.



**Figura 2. Hibridación *in situ* con *sry* en frotis de células extraídas de médula ósea de ratas aceptores hembras.** A, B y C-Hibridación *in situ* con la sonda DIG-*sry*, se observa la presencia de células DIG-*sry* positivo (células macho). D, E y F- Marcaje del número total de células con Dapi.

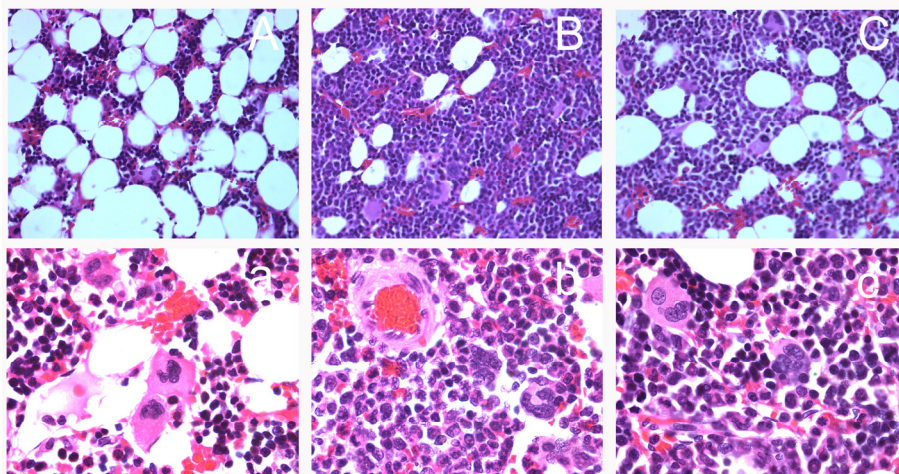
La determinación del gen *sry* también se realizó mediante PCR utilizando como molde DNA de animales trasplantados, Fig. 3. Puede apreciarse la identificación de una banda de hibridación en los tres animales analizados correspondientes al tiempo de 2-3 semanas y que se corresponde con el control positivo de la rata macho y su ausencia en el control negativo de la hembra.



**Figura 3. Las células de macho trasplantadas a las ratas hembras permanecen durante un tiempo no superior a 2-3 semanas.** Southern blot, sonda marcada con  $P^{32}$ (YATP). Casos 1, 2 y 3- extracción de DNA de ratas hembras hibridado con el gen *sry*. Control negativo- DNA hembra. Control positivo- DNA macho e hibridación con la sonda *sry*.

#### 4.1.2 El trasplante de rMSCs no generó signos de rechazo inmunológico

Igualmente nos preguntamos si la no detección del cromosoma Y en los animales trasplantados fue ocasionado por una activación del sistema inmune y la consiguiente eliminación de las células trasplantadas. Realizamos experimentos para inhibir el sistema inmune mediante la administración del inmunosupresor tacrolimus. La observación del estado general de los animales cambió notablemente. En el grupo de animales tratados con tacrolimus mostraron un aumento en la mortalidad que fue algo menor en los animales tratados con el inmunosupresor y trasplantados con células MSCs. El análisis de una sección de médula ósea de animales controles y de tratados con tacrolimus solo y con trasplante de MSCs se muestra en la Fig. 4. Se aprecia que a diferencia de los controles, la médula de los animales tratados con tacrolimus se encuentra desestructurada mientras que el trasplante de células da lugar a una médula más equilibrada con presencia de megacariocitos y microestructura celular que indican un estado próximo y compatible con la normalidad. Estos resultados y la nula mortalidad observada en todos los experimentos iniciales de trasplante de células MSCs sugirieron continuar la investigación de terapia celular en osteoporosis usando células de macho y posponer la determinación de los motivos del silencio del sistema inmunitario.



**Figura 4. El trasplante no genera signos de rechazo inmunológico.** A, a- Médula ósea de ratas Control; B, b- Médula ósea de ratas tratadas Tacrolimus; C, c- Médula ósea tratadas con Tacrolimus y con trasplante de células MSCs. Secciones sagitales de la médula ósea en HE. Las mayúsculas corresponden a un aumento de 40x y las minúsculas corresponden a un aumento de 200x

#### 4.2 EL TRASPLANTE DE MSC EN MODELO ANIMAL DE OSTEOPOROSIS.

La posible acción reparadora de las células MSCs fue analizada en un modelo animal de osteoporosis. Los experimentos de trasplantes se efectuaron por dos preguntas: ¿Las células rMSCs participan en el desarrollo osteocondral?, y si lo hacen ¿cómo participan?, ¿es posible inducir una osificación endocondral en la terapia celular en casos de osteoporosis?. Establecidos los grupos como se indica en *Materiales y Métodos*. Siempre aludiremos a CONTROL, control de edad del grupo, OVX control de osteoporosis, OVX+MSC grupo de OVX trasplantados con células MSCs. La pérdida de masa ósea fue confirmada en el estudio radiológico de los huesos. En el presente trabajo mostramos los resultados obtenidos del estudio de la placa de crecimiento como expresión del proceso de condrogénesis y osteogénesis a diferentes tiempos post-trasplante.

Los resultados del análisis histométrico en la placa de crecimiento de la región distal del fémur son mostrados en la Tabla 1. En el grupo Control se observa una disminución fisiológica de la altura de la placa de crecimiento compatible con el aumento de la edad y/o restricción calórica. En el grupo OVX, se observa una significativa disminución progresiva en la altura media del total de las placas de crecimiento femorales mientras que los grupos de animales OVX+MSC muestran un aumento progresivo y significativo en el total de la altura media total de las placas de crecimiento.

**Tabla 1.** Histometría de la placa de crecimiento distal del fémur en ratas control, ovariectomizadas y ovariectomizadas trasplantadas con células de rata con rMSCs. Los grupos OVX y OVX+MSC se comparan con el grupo control. Altura de la placa de crecimiento ( $\mu\text{m}$ ).

	Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
Tiempo/Parámetro	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
6 semanas	250 $\pm$ 26,3	119 $\pm$ 25,2 (**)	181 $\pm$ 8 (**)
18 semanas	193 $\pm$ 14,4	112 $\pm$ 18,2 (**)	210 $\pm$ 20,3 NS
6 meses	126 $\pm$ 15,3	106 $\pm$ 6,9 (*)	254 $\pm$ 26 (*)

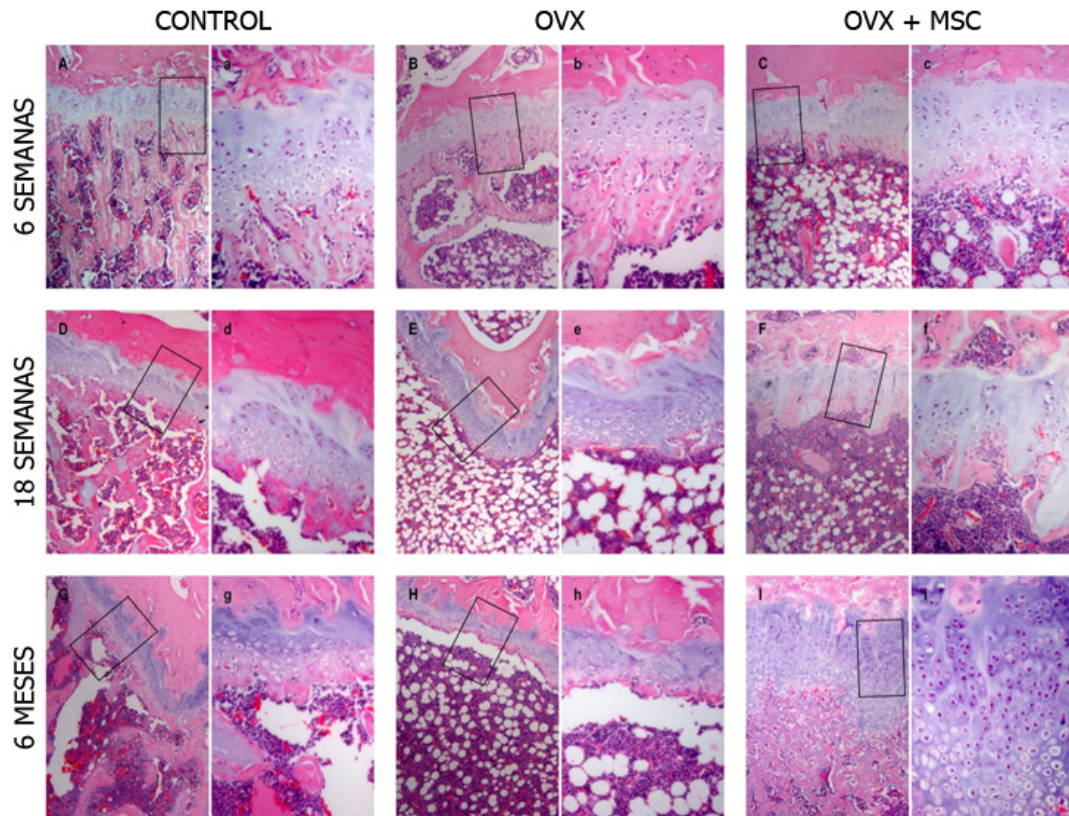
NS. No significativo; \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$  Test t de Student; n. n° de vasos;  $\bar{X}$ , media; SD. Desviación estandar Número de casos n=6. Prueba estadística U-test de Mann-Withney.

El análisis morfológico de la placa se muestra en la composición fotográfica de la Fig. 5. Como se puede observar el grupo Control desde las 6 semanas a los 6 meses, hay una progresiva pérdida de la altura media y de la arquitectura tisular de la placa de crecimiento junto a una progresiva disminución de las trabéculas del hueso (Fig 5 a, d y g).

En el grupo OVX, desde las 6 semanas a los 6 meses, hay una progresiva pérdida de la altura media total de la placa de crecimiento, pérdida de la arquitectura columnar de la placa de crecimiento, una pérdida de las trabéculas primarias y se observa una disminución del patrón vascular en la zona condrometáfisaria (Fig 5 b, e y h). En este grupo se observa una delgada capa de tejido óseo, con una estructura trabecular paralela a la placa de crecimiento, aparece adosada a la superficie condrometáfisaria de la placa de crecimiento, dando lugar a una imagen de sellado óseo. En la médula del hueso se observa una disminución de adipocitos.

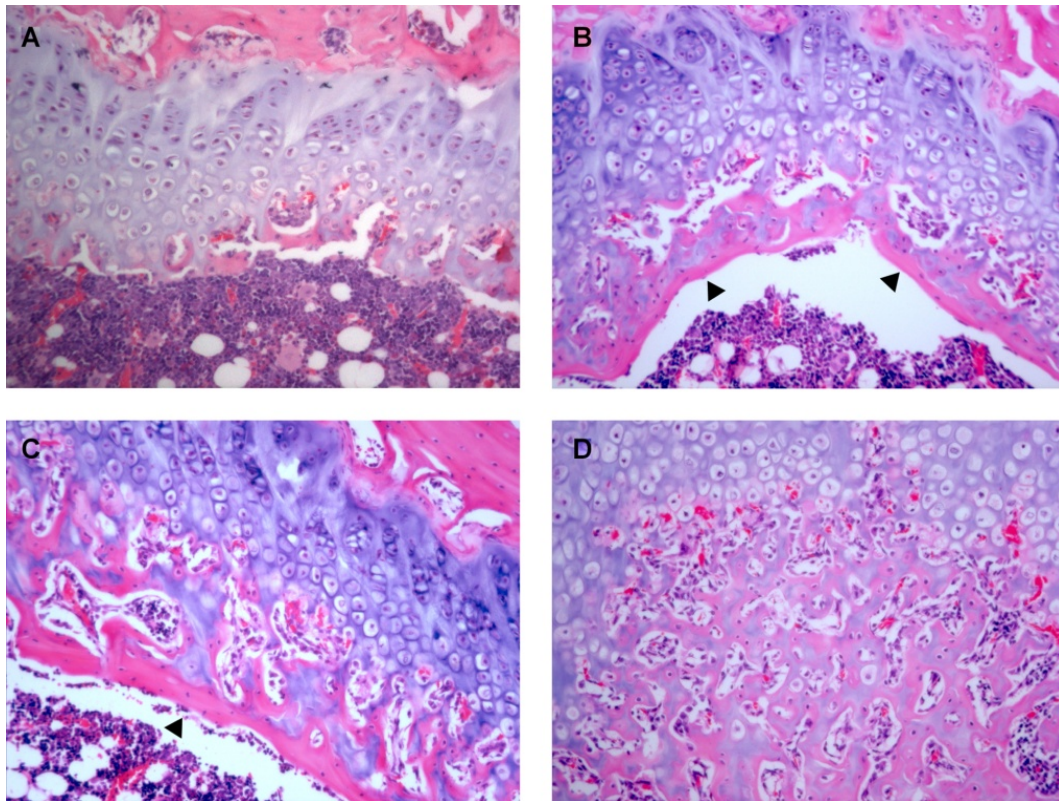
En el grupo OVX + rMSC, desde las 6 semanas a los 6 meses, se observa una aumento progresivo de la altura media total de la placa de crecimiento, y esta altura duplica a la altura media de la placa control. En este grupo la placa de crecimiento conserva una arquitectura tisular normal, con columnas celulares e hiper celularidad en todas las zonas, se observa también un aumento progresivo de trabéculas óseas primarias y una aparición de trabéculas secundarias (Fig 5 c, f y i).





**Figura 5. Efecto de la terapia celular con células rMSCs en un modelo de osteoporosis en la placa de crecimiento en ratas OVX.** Secciones sagitales de la placa de crecimiento de la zona distal femoral en HE. Grupo Control: A-a: a las 6 semanas, D-d: a las 18 semanas y G-g: a los 6 meses. Grupo OVX; B-b: a las 6 semanas, E-e: a las 18 semanas y H-h: a los 6 meses. Grupo OVX + células rMSC: C-c: a las 6 semanas, F-f: a las 18 semanas y I-i: a los 6 meses. Las mayúsculas corresponden a un aumento de 40X y las minúsculas corresponden a un aumento de 200X.

Los resultados muestran que el grupo OVX tratados con células rMSCs experimentan un proceso compatible con la reparación de la placa de crecimiento, las trabéculas y una recuperación del proceso de formación ósea. En este proceso de reparación podemos distinguir cuatro fases que se resumen en la Fig. 6.



**Figura 6. Etapas de reparación del entramado trabecular en un modelo de osteoporosis mediante terapia celular con rMSCs.** Sección frontal de la placa de crecimiento de la zona distal femoral del Grupo OVX + rMSC (HE x200). A-Fase 1°: Recuperación de la arquitectura de zonas y columnas de la placa de crecimiento; B- Fase 2°: Despegamiento de la placa de crecimiento en la zona del sellado óseo; C- Fase 3°: Crecimiento entre la placa y la zona del sellado óseo de trabéculas primarias y D-Fase 4°: Formación de trabéculas secundarias.

Fase 1°: Recuperación de la arquitectura de zonas y columnas de la placa de crecimiento (Fig. 6-A). Aumento del número de células en las tres zonas: zona germinativa, zona proliferativa y zona hipertrófica: así como la aparición del patrón vascular en la zona hipertrófico-metáfisaria.

Fase 2°: Hay un despegamiento de la placa de crecimiento de la zona del sellado óseo (Fig. 6-B). Formación incipiente de trabéculas primarias.

Fase 3°: Formación de trabéculas secundarias (Fig.6-C). Estas trabéculas se forman a partir de la zona hipertrófica. Se crea una solución de continuidad entre la placa de crecimiento y la zona del sellado óseo, de forma tal que la placa de crecimiento regenerada, en la recuperación funcional, se aleja de la zona del sellado óseo.

Fase 4°: Se completa la formación de trabéculas secundarias; y se observa en médula ósea tendencia a la recuperación del patrón de normalidad (Fig. 6-D).

Los resultados muestran que las células rMSCs aisladas de la médula ósea y trasplantadas por la vena caudal del rabo reconocen el daño realizado en los huesos

largos del esqueleto de rata e inducen la osificación endocondral. Los resultados sugieren que las MSCs resultaron oscuras al sistema inmune, inducen los factores que dirigen la neovascularización y remodelación de la placa de crecimiento y trabéculas óseas.

### **4.3 VALORACIÓN ESTEROLÓGICA DE REPARACIÓN DE LAS TRABÉCULAS**

Los resultados anteriores muestran diferencias cualitativas entre los tres grupos de animales. Para valorar cuantitativamente los cambios desarrollados se llevó a cabo un estudio estereológico teniendo en cuenta distintas variables;  $L_T$ - longitud total de la trabécula;  $MTW$ - anchura trabecular;  $MMCL$ - distancia intratrabecular (*Material y Métodos y Anexos*), en las diferentes zonas del hueso; trabéculas epifisarias, trabéculas metafisarias marginales y trabéculas metafisarias centrales. Los especímenes fueron estudiados a las seis semanas y a los seis meses post-trasplante. Todas las medidas se realizaron en preparaciones decalcificadas y teñidas con H-E teniendo en cuenta la matriz mineralizada de las trabéculas y no la zona de osteoide. Las tablas de los resultados obtenidos se encuentran en el Anexo I. y en este apartado resumimos los datos obtenidos

#### **4.3.1 Trabéculas epifisarias**

A. Seis semanas post-trasplante. Como muestra la Tabla s-1 (ver Anexo), a las seis semanas post-trasplante en los grupos OVX y OVX+MSC, se observa una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la longitud total y la anchura de las trabéculas y un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la distancia entre las trabéculas. En el grupo OVX, se observa una disminución más significativa de todos los parámetros. En el grupo OVX+MSC, la anchura de las trabéculas no es significativa con respecto al control pero disminuye.

B. Seis meses post-trasplante. El grupo OVX, a los seis meses post-trasplante, sigue manteniendo diferencias significativas de todos los parámetros con respecto al control, la longitud y la anchura de las trabéculas sigue siendo significativamente menor y la distancia entre las trabéculas es significativamente mayor con respecto al control (Tabla s-2). Sin embargo, el grupo OVX + MSC en ninguno de los parámetros se observan diferencias significativas con respecto al control.

#### **4.3.2 Trabéculas Metafisarias Centrales.**

A. Seis semanas post-trasplante. En los grupos OVX y OVX+MSC observamos una disminución significativa en la longitud y anchura de las trabéculas y un aumento significativo de la distancia entre las mismas, (Tabla s-3).

B. Seis meses post-trasplante. En ambos grupos desaparecen las trabéculas metafisarias centrales, quedando solo presentes en el grupo control. Resultados No mostrados.

#### **4.3.3 Trabéculas Metafisarias Marginales.**

A. Seis semanas post-trasplante. En los grupos OVX y OVX+MSC observamos una disminución significativa en la longitud y anchura de las trabéculas y un aumento significativo de la distancia entre las mismas (Tabla s-4).

B. A los seis meses post-trasplante. En el grupo OVX desaparecen las trabéculas metafisarias marginales. En el grupo OVX+MSC y el Grupo Control persisten las trabéculas metafisarias marginales. El único parámetro que establece diferencias significativas con respecto al control es la distancia intratrabecular, la cual disminuye significativamente en el grupo OVX+MSC con respecto al grupo Control (Tabla s-5).

Los resultados sugieren que las células MSCs estimulan la reparación de trabéculas epifisarias y metafisarias marginales, aumentando la longitud y la anchura de las trabéculas y disminuye la distancia entre las mismas. Este hecho se hace más evidente a los seis meses pos-trasplante.

#### **4.4 ESTUDIO ESTEROLÓGICO DE LA CELULARIDAD DE OSTEOCITOS EN EL HUESO.**

Otro de los aspectos estudiados en los tres grupos de animales consistió en el estudio estereológico de la celularidad teniendo en cuenta distintas variables (*Material y Métodos y Anexo*) y partes del hueso, las trabéculas epifisarias, trabéculas metafisarias centrales y marginales. Los resultados obtenidos han sido tabulados por tipo de célula, lugar y tiempo de post-trasplante Anexo I. Los resultados se resumen de la siguiente manera:

#### 4.4.1 Osteocitos en trabéculas epifisarias, metafisarias centrales y marginales

A. Seis semanas post-trasplante. A las seis semanas de evolución, en el grupo OVX, disminuye significativamente  $p < 0,05$  el número de células, la fracción y el volumen celular en las tres zonas trabeculares analizadas. En el grupo OVX+MSC no se observan diferencias con respecto al grupo Control en todas las variables de las trabéculas, salvo en el número de células de las trabéculas metafisarias marginales que aumenta significativamente con respecto al control y la fracción de volumen celular que disminuye (Tabla s-6).

B. Seis meses post-trasplante. La valoración de osteocitos a los seis meses en el grupo OVX solo se pudo realizar en trabéculas epifisarias, las trabéculas metafisarias centrales y marginales no se analizaron debido a la ausencia de las mismas a los seis meses post-trasplante en los grupos OVX y OVX+MSC. En grupo OVX prevalece una disminución significativa del número de células por unidad de volumen (Nv) en las trabéculas epifisarias (Tabla s-7). En el grupo OVX+MSC no se observan diferencias con respecto al grupo Control en todas las variables de las trabéculas epifisarias y metafisarias marginales, salvo en la disminución significativa de la fracción de volumen celular de las trabéculas epifisarias.

Los resultados sugieren que existe una respuesta celular muy temprana, a las seis semanas del trasplante de las MSCs con un aumento de la celularidad en las trabéculas metafisarias marginales.

#### 4.4.2 Osteocitos en hueso supraplaca, cortical y periostio.

Otro de los aspectos estudiados para valorar cuantitativamente los cambios desarrollados en los tres grupos se llevó a cabo mediante un estudio estereológico de la celularidad teniendo en cuenta distintas variables Nv- Número de células por unidad de volumen; Frv-Fracción de volumen celular; Vc-Volumen celular medio (*Material y Métodos*) en el hueso supraplaca, cortical y periostio

A. Seis semanas post-trasplante. El grupo OVX muestra diferencias significativas con respecto al grupo control en el hueso supraplaca y en la cortical. Sin embargo, no existen diferencias significativas en el periostio. En el grupo OVX+MSC no existen diferencias significativas en ninguna de las tres zonas de hueso. Estos resultados sugieren que la respuesta celular en estas zonas, después del trasplante de MSCs, se realiza precozmente (Tabla s-8).

B. Seis meses post-trasplante. En el grupo OVX persiste la disminución significativa del número de células, Nv. En el grupo OVX+MSC sigue sin haber diferencias significativas con respecto al grupo control. Estos resultados sugieren que la respuesta celular se mantiene en el tiempo (Tabla s-9).

#### **4.5 CONDROCITOS EN LA PLACA DE CRECIMIENTO.**

A. Seis semanas post-trasplante. El grupo OVX tiene una disminución significativa con respecto al grupo control en el número de células, la fracción de volumen celular y volumen celular medio en todas las zonas de la placa de crecimiento. El grupo OVX + MSC tiene una disminución significativa en el número de células por unidad de volumen con respecto al grupo Control salvo en la zona Germinativa, que parece ser una de las primeras zonas donde la placa comienza a reaccionar ante el estímulo de las MSCs trasplantadas (Tabla s-10).

B. Seis meses post-trasplante. A los seis meses de evolución post trasplante en el grupo OVX mantiene una disminución significativa en el número de células por unidad de volumen y la fracción de volumen celular con respecto al control en las tres zonas de la placa de crecimiento, sin embargo, el volumen celular medio no tiene diferencias significativas. El grupo OVX + MSC, en la zona proliferativa y germinativa de la placa de crecimiento no tiene diferencias significativas en todas las variables con respecto al grupo Control. En la zona hipertrófica de la placa de crecimiento, aumenta significativamente el número de células por unidad de volumen. Los resultados sugieren que el estímulo de las células MSCs trasplantadas se mantiene con el tiempo, llegando a reactivar toda la placa de crecimiento (Tabla s-11).

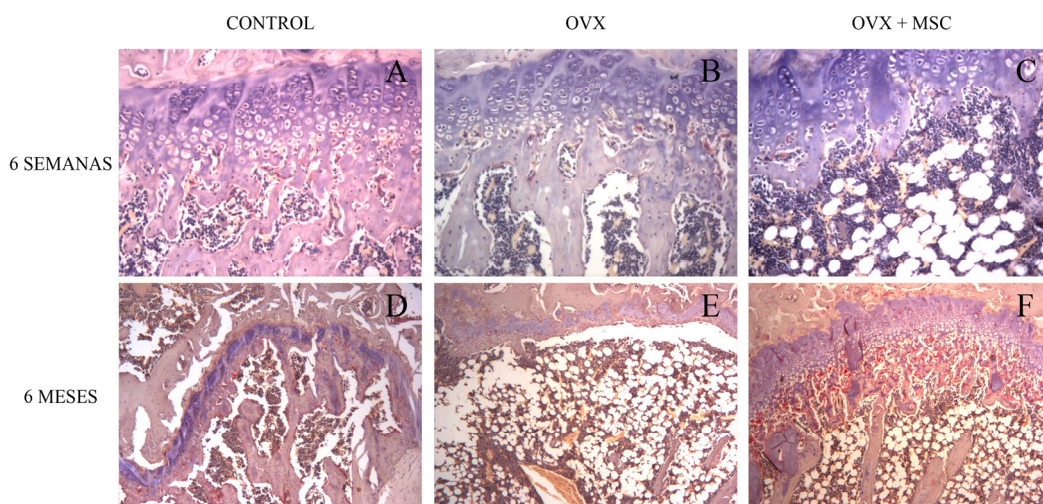
#### **4.6 ESTEREOLOGÍA DE LA CELULARIDAD DE OSTEOCLASTOS EN LOS EXPERIMENTOS DE TRASPLANTES DE MSC.**

Se ha demostrado que en la osteoporosis hay una citopenia del osteoblasto y osteoclasto que impide la homeostasis en la remodelación del hueso. Por ello determinamos los osteoclastos presentes en estos tres grupos de animales mediante inmunohistoquímica con TRAP (*Material y Métodos*). Las valoraciones realizadas son una aproximación al valor real, dado que la medida tiene limitaciones debido a las características morfológicas de los osteoclastos, ya que éstas células tienen grandes prolongaciones citoplasmáticas. Hemos observado que a las seis semanas post-trasplante en el grupo control se observa la presencia de osteoclastos en el hueso. Sin embargo, en los grupos OVX y OVX+MSC disminuye significativamente ( $p < 0,05$ ) el número de células por unidad de volumen así como, la fracción de volumen celular y el

volumen celular medio, siendo éste último significativo solo en el grupo OVX, ver. Tabla s-12 (Figura 7 A-C).

A los seis meses post-trasplante, en el grupo OVX disminuye significativamente el número de células por unidad de volumen con respecto al grupo Control. En el grupo OVX+MSC no se observan diferencias con respecto al número de células por unidad de volumen y aumentan significativamente la fracción celular y el volumen celular medio (Tabla s-13).

La disminución del número de clastos en las trabéculas metafisarias en el grupo OVX a las seis semanas y a los seis meses post-trasplante, se podría atribuir a la ausencia de trabéculas. Sin embargo, desconocemos las causas de la disminución de osteoclastos y se podría sugerir que sea consecuencia del conocido efecto inmunosupresor de las MSCs (Fig. 7 D-F).

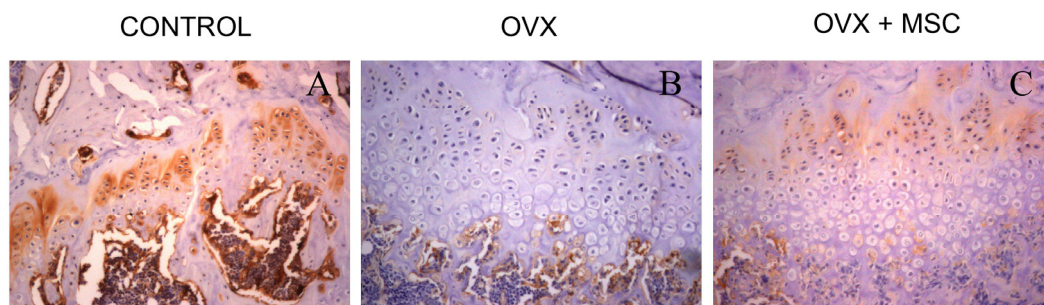


**Figura 7. El tratamiento con rMSCs induce el aumento de osteoclastos en ratas OVX + MSC.** Secciones sagitales de la placa de crecimiento de la zona distal femoral (HE y TRAP). Grupo Control: A: a las 6 semanas, D: a los 6 meses. Grupo OVX; B: a las 6 semanas, E: a los 6 meses. Grupo OVX + células rMSC: C: a las 6 semanas, F: a los 6 meses.

#### 4.7 RECUPERACIÓN DE LA SÍNTESIS DE COLÁGENO TIPO II EN LA PLACA DE CRECIMIENTO.

Para valorar los posibles cambios en la actividad de la placa de crecimiento realizamos mediante inmunohisquímica la detección de Colágeno tipo II (Material y Métodos), una de las proteínas características de la matriz extracelular de la placa de crecimiento sintetizada por las células del proliferativo (Garimella R, 2004). Como puede verse en la Fig. 8, a las 18 semanas post-trasplante el grupo Control expresa Colágeno tipo II en la zona proliferativa de la placa de crecimiento. En el grupo OVX no se observa la expresión de Colágeno tipo II. En el grupo OVX+MSC se observa la expresión de

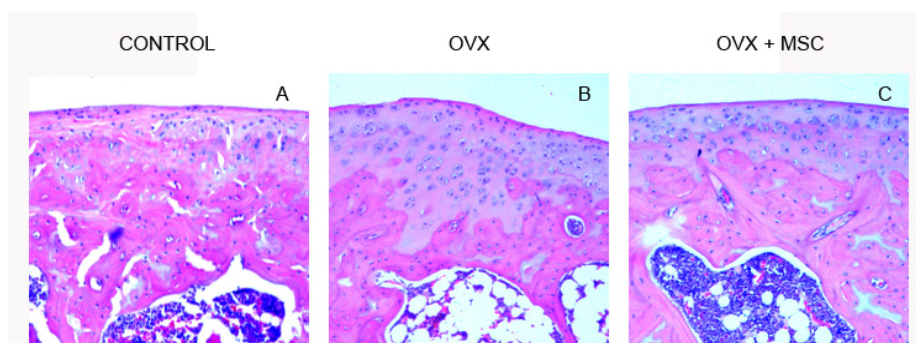
Colágeno tipo II. Estos resultados sugieren que el grupo OVX carece de actividad en la síntesis de Colágeno que se ve recuperada con la adición de las MSCs.



**Figura 8. El tratamiento con rMSCs en ratas OVX conduce a la recuperación del fenotipo osteocondral.** Secciones sagitales de la placa de crecimiento de la zona distal del fémur a las 18 semanas post-trasplante. La visualización del Colágeno tipo II se realizó mediante inmunohistoquímica detectado con un anticuerpo específico y secundarios marcados con Diaminobencidina contrateñido con Hematoxilina. Grupo Control: A, Grupo OVX; B. Grupo OVX + células rMSC: C. (H-Coll II 200X)

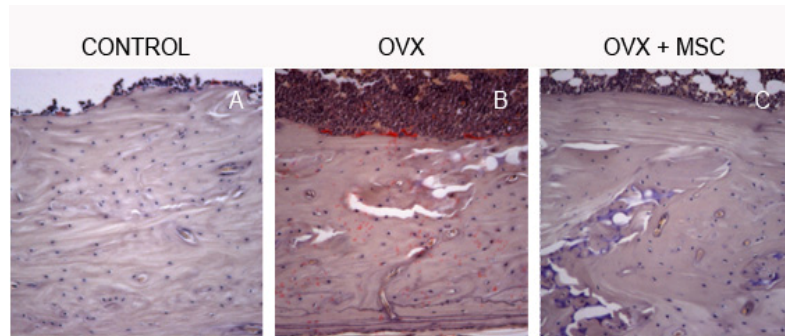
#### 4.8 EFECTO DEL TRASPLANTE DE MSC EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR Y HUESO CORTICAL.

Es conocido que tanto el cartílago articular como los huesos corticales son tejidos con menor capacidad reparadora y un metabolismo más lento que las trabéculas óseas. Aunque el estudio de ambos tejidos no es nuestro objetivo hemos mirado el cartílago articular y hemos buscado la presencia de hueso nuevo en las corticales. Fig 9 y Fig 10. Puede verse que hay tendencia a la reparación de ambos tejidos en los animales tratados con MSCs que serán objetivo de estudios posteriores.



**Figura 9. El tratamiento con rMSCs en ratas OVX conduce a la recuperación del fenotipo en el cartílago articular.** Secciones sagitales del cartílago articular distal del fémur a los seis meses post-trasplante. Grupo Control: A, Grupo OVX; B. Grupo OVX + células rMSC: C. (HE 200X)





**Figura 10. El tratamiento con rMSCs en ratas OVX conduce a la recuperación del fenotipo tisular de la cortical.** Secciones sagitales de la cortical del femur a los 6 meses post-trasplante. Grupo Control: A, Grupo OVX; B. Grupo OVX + células rMSC; C. La parte superior corresponde a endostio (HE 200X).

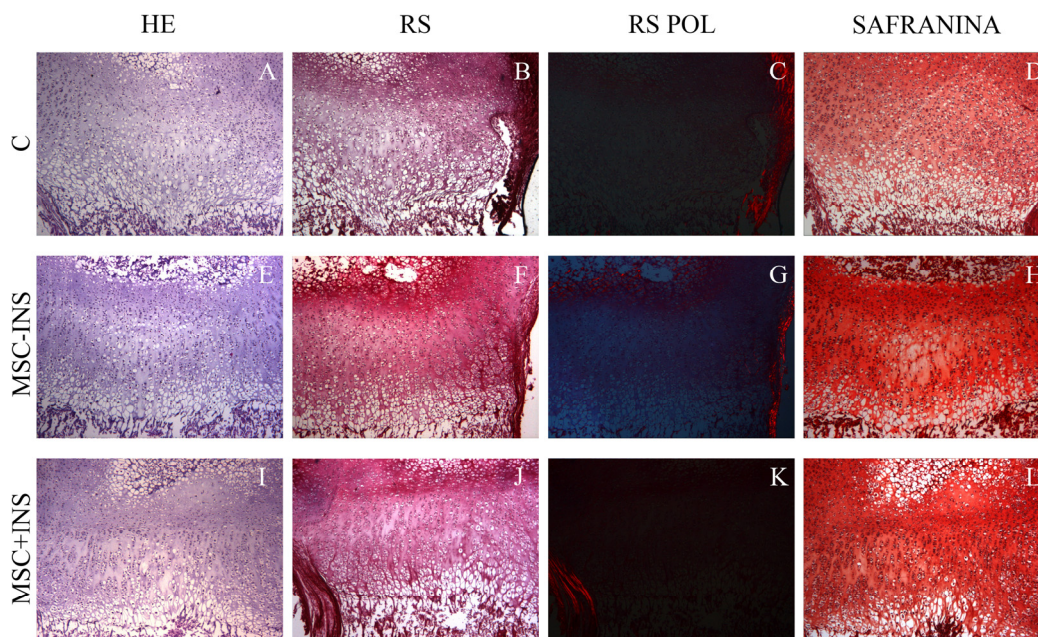
#### 4.9 CO-CULTIVO DE CÉLULAS MSC CON EPÍFISIS-METÁFISIS

Con objeto de analizar la posible comunicación celular entre las MSCs y la placa de crecimiento nos planteamos un modelo in vitro de co-cultivo. En este modelo igualmente estudiamos el efecto de los E2 y la PRL. Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos y hembras de 9 días de edad en un total de 24 animales distribuidos en los siguientes grupos:

##### Ensayo 1:

Co-cultivo de células rMSCs con Epifisis-Metáfisis en presencia o no de inserto:

Ensayo 1	Inserto	MSC
Grupo Control (n=6)	-	-
Grupo MSC-INS (n=6)	-	+
Grupo MSC+INS (n=6)	+	+



**Figura 11.** Secciones sagitales de la epífisis-metáfisis de la zona proximal de la tibia co-cultivada durante una semana en presencia o no de MSCs y de inserto. Teñidas con Hematoxilina –Eosina (HE); Rojo Sirio (RS), y Safranina. Rojo Sirio microscopia con luz polarizada (RS POL). Imágenes tomadas a 400x. Grupo Control (C): A-D especímenes co-cultivados sólo con medio; Grupo MSC-INS: E-H especímenes co-cultivados en presencia de células MSCs sin la interposición de un Inserto. Grupo MSC+INS: I-L especímenes co-cultivados en presencia de células MSCs con la interposición de un Inserto. En las tinciones de rojo sirio analizadas con polarización (C, G y K) las imágenes de birrefringencia en los márgenes de la placa de crecimiento corresponde al anillo pericondral ricos en fibras de colágeno; estas imágenes se han usado como control positivo de técnica.

#### Especímenes del grupo control:

Se observa en la zona proliferativa distribución en columnas bien definida. En la zona hipertrófica la altura de esta zona es similar altura del proliferativo como suele ser habitual, predominan lagunas vacías. En las secciones teñidas con rojo sirio no se observa birrefringencia de los haces de colágeno. En la tinción con safranina se observa poca intensidad de color proporcional a la cantidad de mucopolisacáridos de la matriz extracelular (Fig. 11).

#### Especímenes del grupo MSC-INS:

La zona proliferativa pierde la arquitectura de las columnas celulares como en el grupo MSC + INS. La altura de la zona hipertrófica es menor que la altura de la zona proliferativa, y en las células prevalecen los núcleos hiper cromáticos. En la tinción con rojo sirio se observan en las zonas proliferativa e hipertrófica de la placa de crecimiento haces birrefringentes en la matriz extracelular. En la tinción con safranina se observa la matriz hiper cromática compatible con la cantidad de mucopolisacáridos de la matriz extracelular (Fig. 11).

### Especímenes del grupo MSC+INS:

La zona proliferativa pierde la arquitectura de columnas celulares, como se veía en el control. La altura de la zona hipertrófica es menor que la altura de la zona del proliferativo y en las células prevalecen los núcleos hipercromáticos. En la tinción con rojo sirio no se observan birrefringencia de los haces de colágeno. En la tinción con safranina se observa la matriz más hipercromática que en el grupo control (Fig. 11).

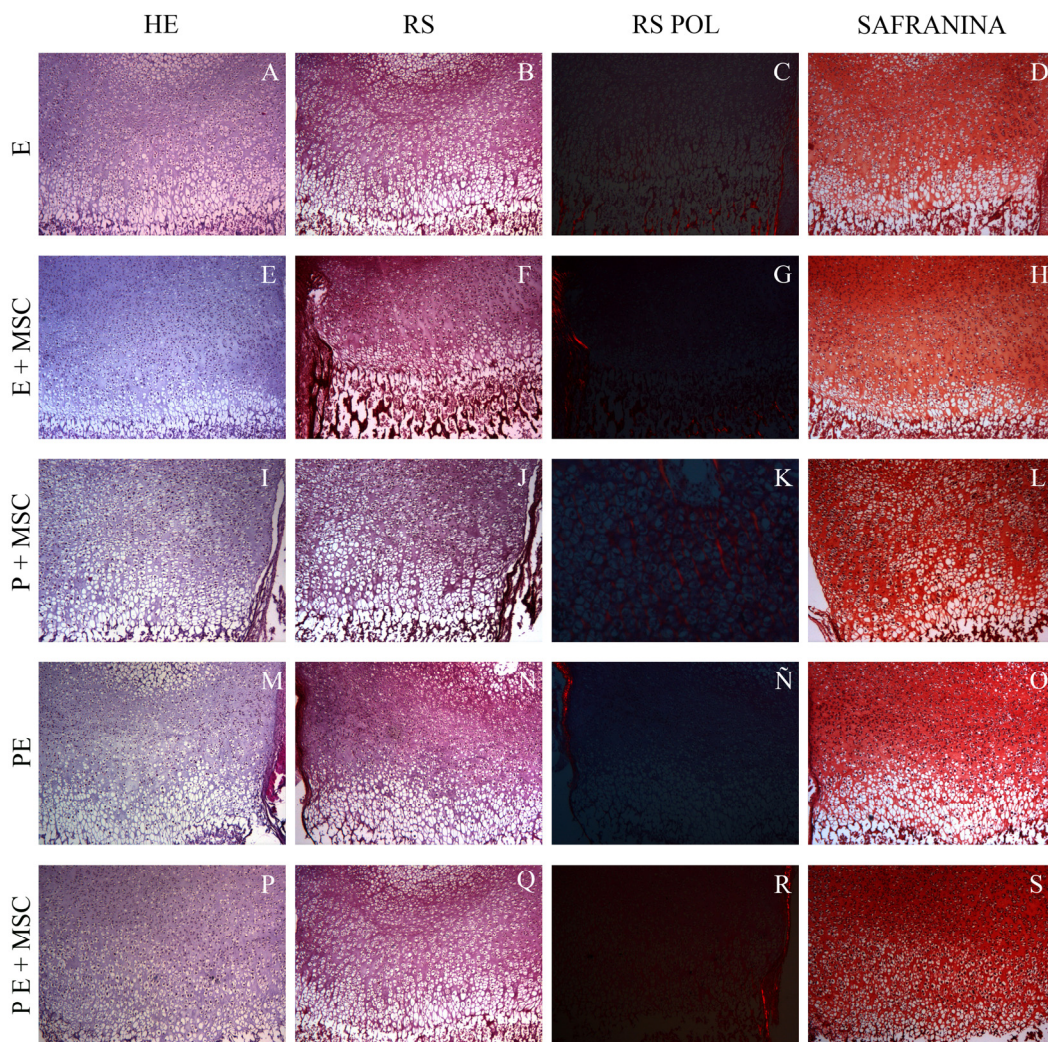
La valoración de este ensayo nos muestra que el co-cultivo con células MSCs se acompaña de una actividad celular de la zona hipertrófica con núcleos hipercromáticos y con signos de actividad celular tal es la birrefringencia, expresión de producción de colágeno, y una matriz extracelular safranina positiva, lo que significa una aumento de mucopolisacaridos (Fig. 11).

En el caso del inserto, sin estar en contacto directo con el tejido cultivado, existiendo como única interposición la membrana del inserto, observamos que las células cultivadas ejercen una actividad biológica sobre el tejido osteocondral en cultivo por medio de unos mediadores biológicos que hasta ahora desconocemos.

### Ensayo 2:

Co-cultivo de células MSCs con Epifisis-Metáfisis e inserto tratadas o no con Prolactina 40 ng/ml y/o Estrógenos 40 nM:

Ensayo 2	PRL	E2	MSC
Grupo E (n=6)	-	+	-
Grupo E + MSC (n=6)	-	+	+
Grupo P + MSC (n=6)	+	-	+
Grupo PE (n=6)	+	+	-
Grupo PE + MSC (n=6)	+	+	+



**Figura 12.** Secciones sagitales de la epífisis-metáfisis de la zona proximal de la tibia co-cultivada durante una semana en presencia o no de MSCs y de distintos factores reguladores: PRL y E2. Teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE); Rojo Sirio (RS), y Safranina. Rojo Sirio microscopía con luz polarizada (RS POL). Imágenes tomadas a 400x. Grupo E: A-D, especímenes tratados con E2; Grupo E+MSC: E-H, especímenes tratados con E2 en presencia de MSC; Grupo P+MSC: I-L, especímenes tratados con PRL en presencia de MSCs; Grupo PE: M-O, especímenes tratados con PRL y E2; Grupo PE+MSC: P-S; especímenes tratados con PRL y E2 en presencia de MSCs. En las tinciones de rojo sirio analizadas con polarización (C, G, K, Ñ y R) las imágenes de birrefringencia en los márgenes de la placa de crecimiento corresponde al anillo pericondral ricos en fibras de colágeno; estas imágenes se han usado como control positivo de técnica.

### Especímenes del grupo E:

La zona proliferativa mantiene la arquitectura de las columnas celulares. La altura de la zona hipertrófica es igual que la altura de la zona proliferativa, y en las células prevalecen los núcleos hiper cromáticos. La arquitectura de la zona hipertrófica está marcada por columnas compuestas por numerosas células. En la tinción con rojo sirio no se observan haces birrefringentes en la matriz extracelular. En la tinción con safranina se observa la matriz *hipocromática* compatible con escasa cantidad de mucopolisacáridos de la matriz extracelular (Fig. 12).

**Especímenes del grupo E+MSC:**

La zona proliferativa pierde la arquitectura de columnas celulares. La altura de la zona hipertrófica es menor que la altura de la zona proliferativa, y en las células prevalecen los núcleos hipercromáticos. En la tinción con rojo sirio no se observan en las zonas proliferativa e hipertrófica de la placa de crecimiento haces birrefringentes en la matriz extracelular. En la tinción con safranina se observa la matriz *hipocromática* (Fig. 12).

**Especímenes del grupo P+MSC:**

La zona proliferativa pierde la arquitectura de columnas celulares. La altura de la zona hipertrófica es similar que la altura de la zona proliferativa, y en las células prevalecen los núcleos hipercromáticos. En la tinción con rojo sirio se observan en las zonas proliferativa e hipertrófica de la placa de crecimiento haces birrefringentes en la matriz extracelular. En la tinción con safranina se observa la matriz *hipercromática* (Fig. 12).

**Especímenes del grupo PE:**

La zona proliferativa no mantiene la arquitectura de las columnas celulares. La altura de la zona hipertrófica es igual que la altura de la zona proliferativa, y en las células prevalecen los núcleos hipercromáticos. En la tinción con rojo sirio no se observan haces birrefringentes en la matriz extracelular. En la tinción con safranina se observa la matriz *hipercromática* (Fig. 12).

**Especímenes del grupo PE+MSC:**

La zona proliferativa mantiene la arquitectura de las columnas celulares. La altura de la zona hipertrófica es menor que la altura de la zona proliferativa, y en las células prevalecen los núcleos hipercromáticos. En la tinción con rojo sirio no se observan haces birrefringentes, o es muy tenue la birrefringencia, en las zonas proliferativa e hipertrófica de la placa de crecimiento en la matriz extracelular. En la tinción con safranina se observa la matriz *hipercromática* compatible con la cantidad de mucopolisacáridos de la matriz extracelular (Fig. 12).

La valoración de este ensayo nos muestra que el co-cultivo con células MSCs con la presencia de P y E conjunta o independientemente, se acompaña también de una actividad celular, tal como la presencia de núcleos hipercromáticos de la zona hipertrófica (circunstancia no habitual) y signos de manifestación de actividad celular

como la producción de colágeno y un aumento de mucopolisacáridos en la matriz extracelular (Fig. 12).

Es difícil discernir en este ensayo la implicación de cada una de las hormonas en las zonas analizadas.

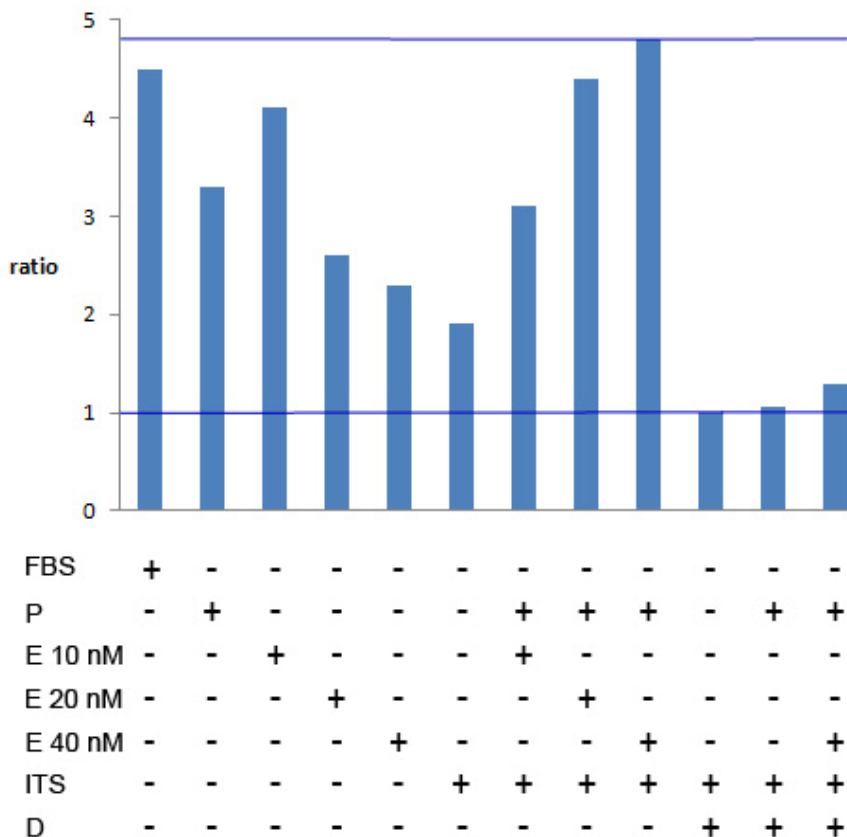
#### **4.10 LA PRL MODULA LA ACCIÓN PROLIFERATIVA DE LOS E2 EN LAS MSC.**

Resultados previos han puesto de manifiesto el efecto proliferativo de la PRL en las células MSCs (Ogueta et al, 2002) y la acción moduladora de PRL y E2 en células epiteliales y tumores de la glándula mamaria (Clevenger *et al.*, 2002). Estos hechos hicieron que nos preguntáramos sobre la acción de los estrógenos en las células progenitoras de hueso y la posible relación entre ellos con la PRL y los glucocorticoides.

Los resultados de la acción proliferativa de las MSCs, estimada por la velocidad relativa en la incorporación de  $H^3$ -Timidina en respuesta a E2 (E), PRL (P) y Dexametasona (D) se muestra en la Fig.13. La incorporación obtenida en medio con suero fetal bovino (F) fue usada como control positivo de proliferación. El valor control más bajo de incorporación se obtuvo en las células incubadas con medio básico de diferenciación (ITS) y tratadas con Dex (0,1  $\mu$ M). Los resultados son la media de tres experimentos diferentes realizado cada uno de ellos con triplicados de muestra.

Las células se trataron con diferentes concentraciones de E2, en presencia o ausencia de PRL y Dex. Como puede apreciarse E2, a 10 nM, produjo un aumento muy significativo de la proliferación en las MSCs, mientras que la inducción a 20 y 40 nM no fueron lineales. En presencia de 40 ng/ml PRL, las células experimentaron un aumento significativo de la proliferación y aumentaron la acción de E2 en todas las concentraciones ensayadas.

La acción proliferativa de PRL y E2 en las células progenitoras de hueso resultó ser similar a los valores obtenidos con FBS y predominantemente inhibida por Dex. La regulación por PRL, E2 y Dex encontrada en las MSCs es similar a la descrita en células de glándula mamaria.



**Figura 13. La PRL, E2 y Dex regulan la expansión de las hMSCs.** Se sembraron  $1.5 \times 10^4$  células y se cultivaron en placas M24 durante 48 horas. La proliferación celular se estimó mediante la incorporación de  $^3\text{H}$  timidina ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ) durante las 16 últimas horas en ayunas y tratadas o no con: Suero fetal bovino FBS 10%, Prolactina P ( $40 \text{ ng/ml}$ ), Estrógenos E ( $10 \text{ nM}$ ), E ( $20\text{nM}$ ), E ( $40\text{nM}$ ), ITS (medio de diferenciación) o Dexametasona D ( $0.1 \mu\text{M}$ ). Las células fueron lisadas en agua y dos ciclos de congelación/descongelación. El DNA marcado fue recogido por filtración y la radiactividad cuantificada en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan por la razón entre la velocidad de proliferación celular con respecto al control y son los resultados de un experimento completo de los tres realizados.

La relación entre PRL y E2 también fue analizada en células humanas y en presencia de agonistas y antagonistas de la acción de los E2. La acción proliferativa se midió en esta ocasión contando el porcentaje de células en proliferación por inmunocitoquímica con el anticuerpo con Ki67 (en rojo), con respecto al total, marcadas con DAPI (en azul) (Tabla 2). La acción proliferativa potenciada por la adición de ambas hormonas se vio confirmada. La presencia de inhibidores sugiere que la acción de los estrógenos es regulada de manera importante por la señalización mediada por el ER $\alpha$ .

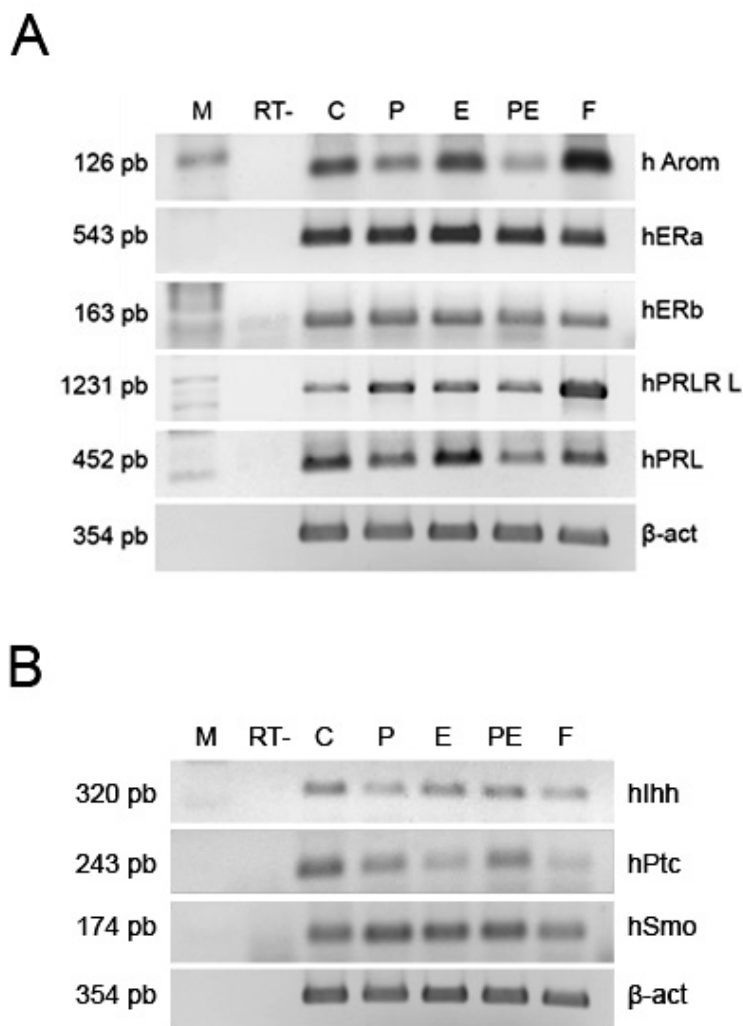
TRATAMIENTOS	Diana del inhibidor	% DE PROLIFERACIÓN
C (ITS)	---	51,10
F	---	100
P+E	---	98,76
P+E+ICI	ER $\alpha$ y ER $\beta$	58,39
P+E+LiCl	GSK-3 $\beta$	84,77
P+E+PHTPP	ER $\beta$	97,36
P+E+Estren	Antag E	44,78

**Tabla 2. Los estrógenos median la proliferación inducida por la PRL en hMSCs.** Se sembraron  $1.5 \times 10^4$  células y se cultivaron durante 16 horas en ayunas y posteriormente durante 72 horas tratadas o no con la presencia de: Suero fetal bovino FBS 10% F, Prolactina P (40 ng/ml), Estrógenos E (40nM) e ITS (Medio de diferenciación) C, ICI (100 nM), LiCl (10 nM), PHTPP (100 nM) y Estren (10nM). Las células fueron marcadas mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo Ki67 para establecer el porcentaje de proliferación. Los resultados se expresan en porcentaje de núcleos marcados con Ki67 en relación al total marcados con Dapi.

#### 4.11 LOS SISTEMAS REGULADORES PRL-PRLR Y E2-ER ESTÁN EN LAS MSC.

Los E2 ejercen su acción celular mediada por la expresión de dos formas de su receptor  $\alpha$  y  $\beta$  miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Rosenfeld *et al.*, 2006). Igualmente es conocido que los tejidos pueden sintetizar estrógenos desde precursores esteroídicos circulantes siempre que expresen la isoforma A de la enzima aromatasa o Cyp19 (Riggs *et al.*, 2002). Si además tenemos presente los datos mostrados en los apartados anteriores nos pareció de interés determinar la expresión de ambos sistemas reguladores en las rMSCs diferenciadas en presencia de PRL, E2 o ambos. Como control utilizamos hMSCs en medio de diferenciación y con FBS. Los resultados que se muestran en la Fig.14-A son los obtenidos de un experimento completo de los tres realizados. Los tratamientos fueron realizados durante una semana con dos cambios de medio. Las extracciones de mRNA se realizaron alícuotas de rMSCs ( $2 \times 10^6$ ) y los transcritos relacionados con los sistemas E2-ER y PRL-PRLR se determinaron mediante RT-PCR comparativa. Como puede verse, las MSCs expresan aromatasa, ER- $\alpha$  y  $\beta$  y la isoforma larga del receptor de PRL (PRLRL) y PRL en todas las circunstancias. Lo mismo sucede con la expresión del eje regulador de hueso *Ihh/Ptc/Smo* que está presente en las células hMSCs, Fig 14-B. Los resultados sugieren la posibilidad de que ambos sistemas realicen una actividad autocrina/paracrina en las MSCs y forman parte de los reguladores existentes en los nichos óseos.





**Figura 14. Las células hMSCs expresan E2, PRL e *Ihh* y sus elementos de translación celular.** Los RNAs totales fueron aislados a partir de un cultivo de células ( $1 \times 10^6$ ) incubadas durante una semana en un medio definido en la ausencia (C) o en la presencia de los factores reguladores indicados a las mismas concentraciones establecidas en la figura 13: prolactina (P), estrógenos (E), prolactina y estrógenos (PE) y Suero (F). La imagen es el negativo de una tinción en un gel de agarosa en bromuro de etidio, mostrando los productos de la PCR. En la columna RT- se muestra el control de la reacción y la columna M indica el marcador  $\phi 29$ -HindIII utilizado. Los oligos específicos utilizados se describen en el apartado de *Material y Métodos*.

#### 4.12 PROLACTINA Y ESTRÓGENOS PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA VÍA JAK-STAT Y LA DEXAMETASONA TIENE UNA ACCIÓN DOMINANTE NEGATIVA SOBRE EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS.

La siguiente pregunta planteada fue saber cómo los sistemas reguladores PRL-PRLR y E-ER regulan la expresión génica en las células progenitoras de hueso. Estudiamos mediante microscopía de fluorescencia la posible modulación de los factores de transcripción de la familia STAT y E2R determinando la asociación a las proteínas de la matriz nuclear, como se indica en *Materiales y Métodos*. Para ello se trataron las células con PRL, E, PE, PED, y como control C, medio de diferenciación utilizado como

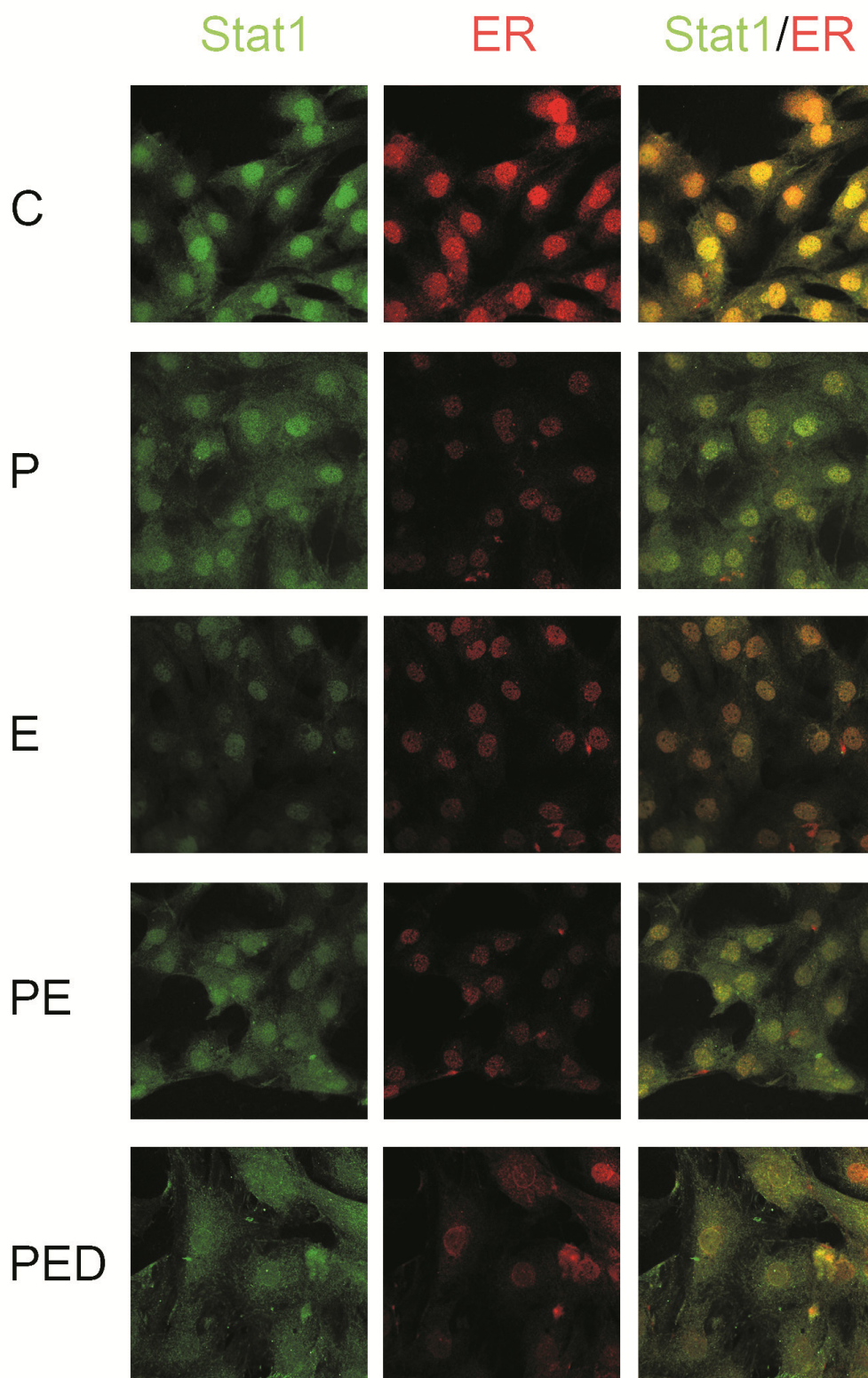
base en todas las células y se analizaron los factores de transcripción STAT1, STAT3, STAT5 y ER mediante anticuerpos específicos.

Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en las Fig. 15-17. De cada tratamiento se ha seleccionado un campo representativo y mostramos la inmunofluorescencia de los factores de transcripción de la familia STAT en color verde y el correspondiente a ER en rojo, la proximidad entre STAT y ER conduce a un color amarillo. Los resultados son un ejemplo de tres experimentos diferentes. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones de intensidad y tiempo de exposición.

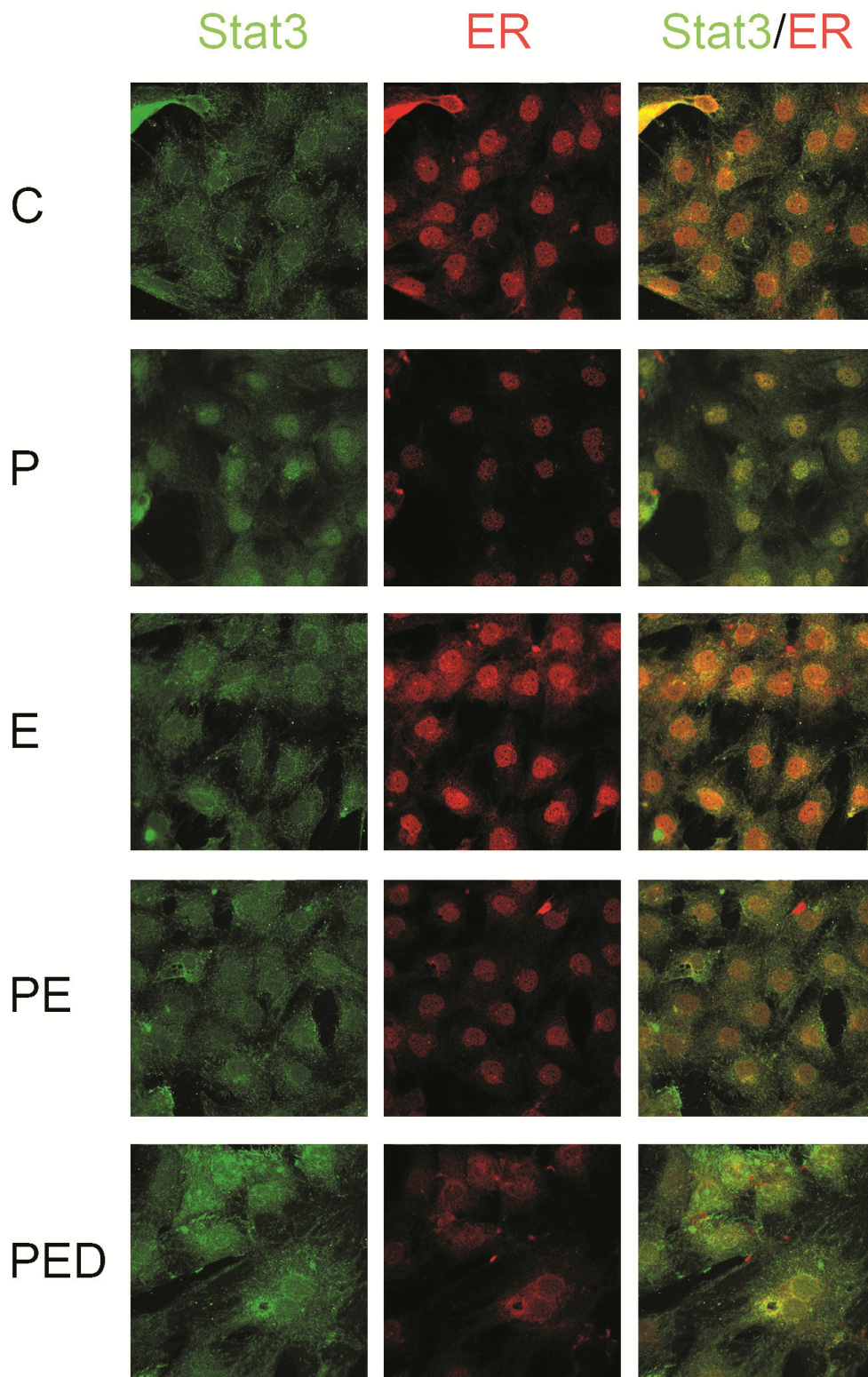
STAT1 y STAT5 se localizan mayoritariamente en el núcleo en cualquiera de los tratamientos. Sin embargo, STAT3 se observa principalmente en una localización perinuclear, salvo en presencia de P con una predominancia nuclear. Este resultado está en consonancia con resultados previos que describen la activación de la STAT3 mediada por PRL (Olazabal, *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la relación entre PRL y E2 es mediada, al menos en parte, por la regulación de la vía Jak-STAT. Las bases moleculares necesitan ser exploradas con más detalle para ayudarnos a interpretar el papel de ambas hormonas en hueso, osteoporosis, mama, próstata, hueso y metástasis, etc.

Por otra parte, podemos observar que en las células tratadas con el medio de diferenciación C, P, E y PE, el receptor de estrógenos permanece localizado principalmente en el núcleo. Sin embargo, en presencia de Dex, la localización y distribución de ER se limita mayoritariamente a una zona perinuclear. Este resultado concuerda con estudios previos que indican que los glucocorticoides inhiben las respuestas a estrógenos (Rhen, *et al.*, 2003). El tratamiento con Dex atenúa la expresión uterina de IGF-I (*Insulin-like Growth factor-I*) inducida por los estrógenos (Sahlin, 1995); bloquea el efecto estimulador de los estrógenos sobre la proliferación de células MCF-7 (línea celular de adenocarcinoma de mama humano). Además, se ha demostrado que la activación de GR (receptor de glucocorticoides) por Dex induce la expresión y la actividad de la sulfotransferasa SUL1E1, la cual a su vez facilita la desactivación de la señalización de estrógenos e inhibe el crecimiento del cáncer de mama dependiente de E2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Gong, *et al.*, 2008).

Actualmente, los glucocorticoides son la droga antiinflamatoria e inmunosupresora más frecuentemente prescrita. Es conocido el papel fundamental que los estrógenos desempeñan en el desarrollo y mantenimiento del hueso, la inhibición de la actividad estrogénica mediante estos tratamientos debe tener importantes implicaciones en la homeostasis del tejido óseo.



**Figura 15. Determinación de STAT1/ER a la matriz nuclear durante la diferenciación ósea de las hMSCs.** Las células fueron sembradas por triplicado y diferenciadas como se indica en *Materiales y Métodos*, en presencia de distintos factores reguladores; P, E, PE y PED durante una semana. La determinación de STAT1 y ER se realizó con anticuerpos específicos y anticuerpos secundarios marcados con Alexa-488 en verde, en el caso de la  $\alpha$ -STAT y Alexa-594, en rojo para  $\alpha$ -ER. Las imágenes corresponden a un aumento de 40x y se adquirieron con un microscopio Olympus acoplado a una cámara ccd.



**Figura 16. Determinación de STAT3/ER a la matriz nuclear durante la diferenciación ósea de las hMSCs.** Las células se trataron de igual forma que la figura 15. La imagen pertenece a la determinación de STAT3 (en verde) y ER (en rojo) en la matriz nuclear.

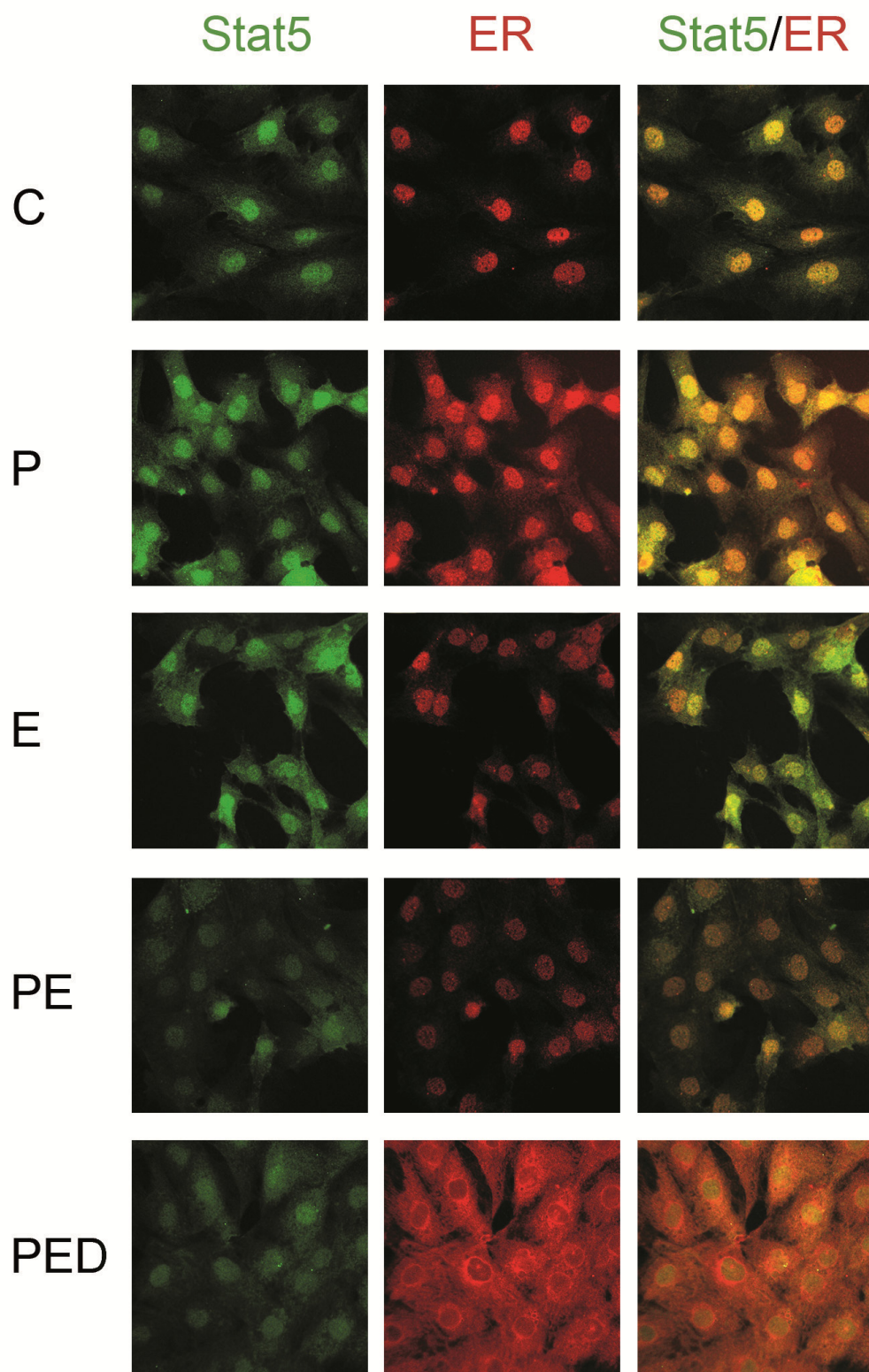


Figura 17. Determinación de STAT5/ER asociadas a la matriz nuclear durante la diferenciación ósea de las hMSCs. Imágenes de STAT5 en verde y ER en rojo.

## **5** DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo aportan datos esperanzadores sobre la terapia celular en la enfermedad degenerativa mayoritaria del esqueleto óseo, la osteoporosis. Ésta se define como enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por la pérdida de masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad al riesgo de fracturas (Bilezikian *et al.* 1996, pp 979). Los resultados del trabajo muestran que la inyección intravenosa de rMSCs produjo una reducción significativa del fenotipo osteoporótico en el modelo murino experimental desarrollado. El alotrasplante de rMSCs aisladas de médula ósea de ratas macho a hembras condujo a una rápida recuperación de la arquitectura de las tres zonas de la placa y a la aparición del patrón vascular en la región condrometafisaria de la misma. A los seis meses post-trasplante se consigue la recuperación tanto de trabéculas metafisarias como epifisarias. El tratamiento celular restablece la celularidad, y se observó que el tratamiento con rMSCs conduce a parámetros similares a los obtenidos en los animales no osteoporóticos. La reactivación de la placa producida alcanza a todas las regiones metafisarias y además se observó el manteniendo del equilibrio entre las células en división, condroblastos productores de matriz extracelular y condrocitos hipertróficos. Nos resulta digno de mención el hecho de que la administración de rMSCs logra recuperar la síntesis de colágeno tipo II. Los resultados muestran además que las células MSCs tienen dos sistemas reguladores formados por la citoquina hematopoyética PRL y su receptor y E2 y su receptor, que pueden actuar auto/paracrinamente regulando las vías celulares Jak-STAT y E2R. Estos sistemas inducen la proliferación de las células progenitoras y proporcionan elementos celulares que en *Drosophila Melanogaster* sirven para la homeostasis del tejido del intestino medio y para el reconocimiento espacio-temporal durante las migraciones celulares de la oogénesis (Jiang *et al.*, 2009).

### **¿Regeneración morfológica/reparación?**

Resulta difícil saber si los resultados de la reparación de las trabéculas en los animales osteoporóticos que mostramos es el resultado de un proceso reparador, dentro del proceso de remodelación ósea, o por el contrario el proceso de reparación forma parte de una regeneración morfológica de la placa de crecimiento y las trabéculas. Se ha estimado que la tibia de rata se forma mediante cincuenta divisiones celulares en la placa de crecimiento y que la composición porcentual de un volumen de placa de crecimiento sería, 9% de células, 32,5% matriz extracelular y 59 % de condrocitos hipertróficos. Este equilibrio se mantiene gracias a numerosos mecanismos que condicionan la formación de huesos largos. Desde el inicio de su desarrollo, el tejido óseo se encuentra dentro de un molde cerrado, el periostio, que además de aportar factores reguladores que se difunden por el hueso membranoso, constituye una capa

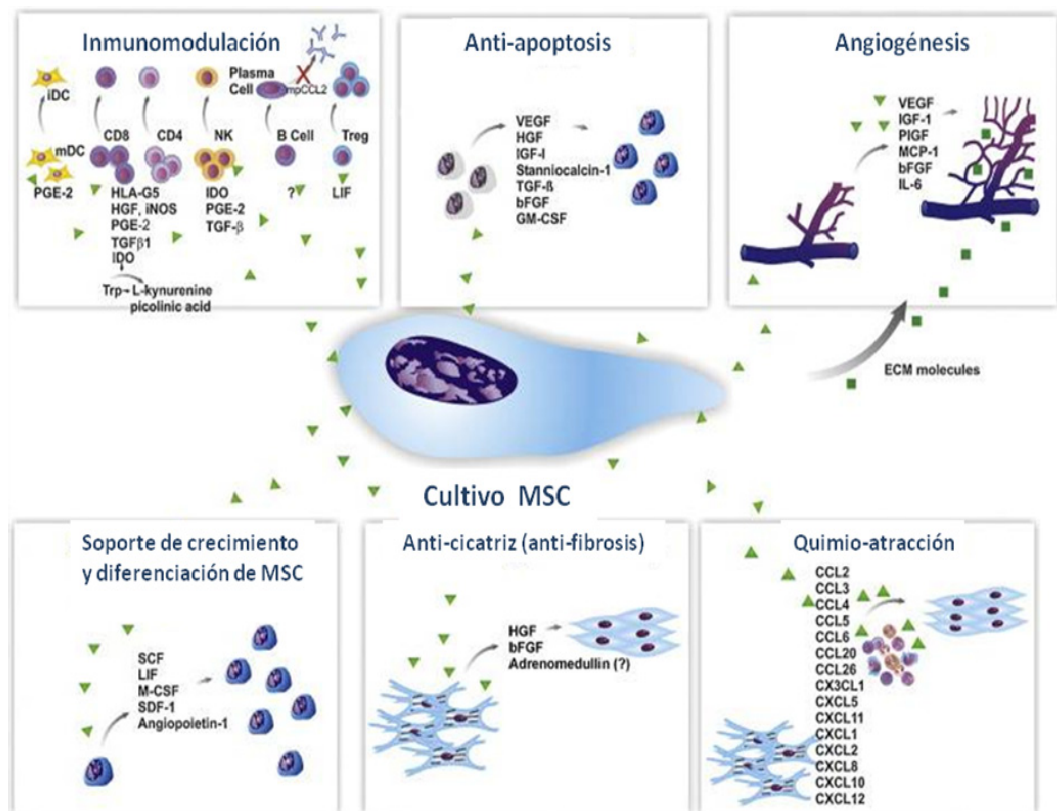
fibrosa que frena el crecimiento del tejido (Hall, 2005. pp13-30). Asimismo, la mineralización de la matriz y los tejidos adyacentes como músculo y tendones hacen de freno al crecimiento y permiten diferentes microambientes óseos (Uccelli *et al.*, 2008). No hay duda de las grandes lagunas existentes en el conocimiento de la biología de las células dentro de los tejidos y de los órganos, la homeostasis estructural y funcional y la respuesta específica del tejido frente a un insulto. En el caso del esqueleto óseo, Caplan reconoce en una de sus revisiones sobre terapia celular lo llamativo que resulta la ausencia de datos experimentales sobre la terapia celular aplicada al hueso. En nuestra experiencia, este problema puede radicar en la dificultad para encontrar un modelo animal de osteoporosis apropiado. El modelo osteoporótico utilizado, en el que los animales además de haber sufrido una ovariectomía, se han mantenido con una dieta que no permite el aumento de leptina concomitante a la ovariectomía en los murinos (Takeda *et al.*, 2002), ha resultado ser de gran utilidad para estudiar la terapia celular en osteoporosis.

La reparación histológica observada en los animales osteoporóticos tratados con rMSCs ha de ser resultado de la actividad de células endógenas, como sugiere la ausencia del gen *sry* en la médula ósea y secciones óseas después de tres semanas postrasplante. Interpretamos que los resultados son debidos a la capacidad de las MSCs en producir factores inductores de la reparación o regeneración de la placa. El daño ocasionado en la desaparición de las trabéculas epifisarias y metafisarias debe servir de manera directa o indirecta de atractor de las MSCs al daño y ser responsable por consiguiente de la liberación local de los factores tróficos, anti-apoptóticos, proliferativos, angiogénicos e inmunomoduladores (ver resumen de Meirelles (Meirelles *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en los experimentos de co-cultivo añaden evidencias sobre la capacidad de comunicación existente entre la placa de crecimiento y las MSCs. Los datos están en armonía con los resultados obtenidos en terapia celular en otros modelos experimentales de diferentes patologías. Se ha demostrado que las mMSCs producen factores con acción neurotrófica y neuroprotectora (Crigler *et al.*, 2006; Pisati *et al.*, 2007; Ankeny *et al.*, 2004), como el BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), factor que estimula la diferenciación y supervivencia de oligodendrocitos (Linker *et al.*, 2002; Caplan y Dennis, 2006), así como la re-mielinización neuronal (Aharonowiz *et al.*, 2008). Los factores tróficos también han resultado ser beneficiosos en los infartos de miocardio (Assmus *et al.*, 2006; Schachinger *et al.*, 2006a; Schachinger *et al.*, 2006b).

Nuestros datos sugieren que la reparación endógena de la placa y las trabéculas consiste en una estimulación del proceso de osificación endocondral, como indica la mayor proliferación de los precursores orientados en torretas, condroblastos productores de matriz extracelular, condrocitos y condrocitos hipertróficos desde la placa a la cavidad de la médula ósea y proporcionan comunicación entre los elementos celulares de los



nichos (Grellier *et al.*, 2009). De ésta manera se explica la localización de las células productoras de colágeno en la placa de crecimiento estimulada por las rMSCs que no observamos en los controles osteoporóticos.



Esquema 7: Mecanismos de acción celular de las MSCs

Los resultados presentados sugieren que las MSCs inducen la reparación endocondral. Es necesaria nueva experimentación en este modelo ya que reproduce bien las diferencias morfogénicas de los dos tipos de osificación, membranosa y endocondral. ¿Es absolutamente necesaria la placa de crecimiento para reparar las trabéculas óseas? En murinos hemos visto que también se reparan las trabéculas epifisarias, luego se puede sugerir que en los humanos, con la placa de crecimiento atréptica, las MSCs producen un aumento de la reparación de las trabéculas por el mecanismo utilizado en la remodelación ósea.

### ***¿Cómo se produce la reparación?***

Los resultados muestran que el tratamiento del grupo osteoporótico con células rMSCs inducen un proceso de reparación de la placa de crecimiento que se inicia con la aparición de nueva vascularidad en la zona condrometáfisaria. Precisamente durante el desarrollo óseo la vascularización del molde de hueso primitivo, compuesto por

condrocitos, permite el establecimiento del lenguaje celular que da lugar a la aparición de los primeros osteoblastos y al desarrollo de la médula ósea (Karsenty, 1999; Ducy *et al.*, 2000; Hall, 2005. pp 13-30). Por tanto, la aparición de vascularidad es un proceso crucial durante el desarrollo y crecimiento del hueso. Una de las condiciones indispensables para un proceso de reparación es conseguir una adecuada vascularización de la zona. La inducción de la angiogénesis acerca el proceso de reparación ósea al de cicatrización de las heridas. Las MSCs y las células endoteliales de los vasos cuentan con todo un sistema de comunicación endocrina y paracrina que garantiza el suministro de oxígeno y nutrientes imprescindibles para la supervivencia celular durante la reparación del tejido (Grellier *et al.*, 2009). Aunque no ha sido objeto de este estudio, nuestro grupo ha puesto de manifiesto que el eje regulador PRL-PRLR, citoquina hematopoyética, induce la expresión de HIF-1 $\alpha$  y acelera el proceso de reparación hepática (Olazábal *et al.*, 2009).

#### ***¿Qué Aportan la PRL y los E2 en las Células hMSCs? ¿Ayudan en la Reparación?***

El trabajo presentado y datos anteriores del grupo muestran que las MSCs aisladas de médula ósea humana expresan genes necesarios para la diferenciación osteocondral, marcadores específicos de hueso y el sistema de la citoquina hematopoyética PRL y su receptor (Romero-Prado *et al.*, 2006). Asimismo mostramos la expresión de los receptores de E2 y el enzima aromatasa, encargada de la síntesis de E2 a partir de DHE (dehidroepiandrosterona) presente en la circulación sanguínea. Cuando analizamos el efecto de PRL y E2 en la proliferación celular observamos un paralelismo inductor de este proceso, lo que sugiere la posibilidad de que ambos ejes autocrino/paracrinos constituyan elementos clave para la proliferación de las células progenitoras de la placa. Esta estimulación de la proliferación por PRL y E2 se anula con la presencia de dexametasona, lo cual puede ser resultado, al menos en parte, de la retirada del receptor de estrógenos del núcleo en respuesta a Dex.

La homeostasis del intestino de *Drosophila* es regulada por la vía Jak-STATs (Jiang *et al.*, 2009). Los enterocitos dañados del intestino delgado emiten señales de estrés cuando entran en apoptosis, de manera natural o inducida por cambios en el volumen de células del individuo, por tóxicos o por agentes patógenos. En estas circunstancias, las células producen las citoquinas codificadas por los genes *unpaired* (*upd1*, *upd2* y *upd3*, homólogos de las citoquinas IL-6, GH, Epo y PRL de mamífero) que inducen en las células troncales y progenitoras la expresión de los efectores *Domeless* (Dome, receptor similar a los receptores de la familia de citoquinas hematopoyéticas), *Hopscotch* (Hop, una proteína homóloga a Jak), y STAT92E (un factor de transcripción de

la familia con homología STAT). Se ha visto que la vía Upd-Dome-Jak-STAT tiene una implicación decisiva en el desarrollo del ovario de *Drosophila*, determinando la dirección de movimiento mediante la aparición del receptor de ecdisona en el frente de migración celular. Quizás la activación de estas vías esté implicada en la migración de las MSCs para reparar daños en tejidos derivados de las tres capas embrionarias. Los resultados indican que las MSCs son responsables de un sistema reparador en el que puede estar implicada la vía de señalización Jak-STAT.

### **¿Terapia Celular en Osteoporosis?**

El trasplante de rMSCs en murinos no pareció activar una respuesta inmune, lo cual concuerda en gran medida con otros muchos resultados que confirman la característica más universal de las MSCs, producir inmunosupresores que inactivan tanto la respuesta inmune innata como la inducida (Ucelli *et al.*, 2008). Esto ha llevado a sugerir la existencia de un sistema reparador general dirigido por las células mesenquimales que abre nuevos campos de estudio sobre las posibilidades terapéuticas de éstas. La célula responsable de los procesos reparadores, como la cicatrización de una herida, necesita tres cualidades: inducir factores inmunosupresores, la neovascularidad de la zona dañada y producir factores para que proliferen/diferencien las células progenitoras de los tejidos dañados, que en el caso de la osteoporosis son los huesos largos y las vértebras. La elección de una célula de origen mesengénico como la estromal explicaría la capacidad de migrar en las tres direcciones buscando el daño así como tener la capacidad de interactuar con células derivadas de las tres capas embrionarias.

Pensamos que nuestros datos son esperanzadores para la terapia celular en la osteoporosis. El aislamiento y cultivo de las células MSC requiere avances científicos que garanticen el estado de las células, pues en caso contrario se pueden producir situaciones compatibles con la aparición de condrosarcomas y/o aceleración del crecimiento de tumores y metástasis.

## **6 CONCLUSIONES**

1. La ovariectomía y la restricción energética en rata conduce a la pérdida del hueso trabecular de los huesos largos compatible con un modelo animal de la enfermedad degenerativa del esqueleto humano conocida como osteoporosis.

2. Los animales osteoporóticos tratados con las rMSCs recuperan la formación de trabéculas. La valoración esterológica de las trabéculas en los grupos estudiados sugieren que los factores producidos por MSCs estimulan la reparación de las trabéculas epifisarias y metafisarias aumentando la longitud y anchura así como disminuyendo la distancia entre ellas.

3. Las rMSCs no están presentes en la médula ósea de rata a tiempos superiores a un mes post-trasplante.

4. El co-cultivo de MSCs y la placa de crecimiento conduce a cambios en la placa que denotan una activación de la zona proliferativa.

5. El efecto de la terapia celular que mostramos ha de ser resultado de los factores liberados por las células MSCs trasplantadas.

6. Las hMSCs expresan los sistemas reguladores de la prolactina y su receptor y el  $17\beta$ -estradiol y su receptor en condiciones de diferenciación osteogénica.

7. Las hMSCs en condiciones de diferenciación osteogénica presentan los factores STAT1 y STAT5 asociados a la matriz nuclear.

8. La prolactina induce la asociación de STAT3 a la matriz nuclear en las hMSCs.

9. La acción de la dexametasona tiene un efecto dominante negativo sobre la presencia del receptor de estrógenos en el núcleo de las hMSC.

## **7 BIBLIOGRAFÍA**

**Aharonowiz, M., Einstein, O., Fainstein, N., Lassmann, H., Reubinoff, B., Ben-Hur, T.** 2008. Neuroprotective effect of transplanted human embryonic stem cell-derived neural precursors in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS One* 3 (9): e3145.

**Alonso-Magdalena, P., Brossner, C., Reiner, A., Cheng, G., Sugiyama, N., Warner, M., Gustafsson, J.A.** 2009. A role for epithelial-mesenchymal transition in the etiology of benign prostatic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (8): 2859-2863.

**Ankeny, D.P., McTigue, D.M., Jakeman, L.B.** 2004. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 190 (1): 17-31.

**Arpino, G., Wiechmann, L., Osborne, C.K., Schiff, R.** 2008. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev* 29 (2): 217-233.

**Assmus, B., Honold, J., Schachinger, V., Britten, M.B., Fischer-Rasokat, U., Lehmann, R., Teupe, C. Pistorius, K., Martin, H., Abolmaali, N.D., Tonn, T., Dimmeler, S., Zeiher, A.M.** 2006. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 355 (12): 1222-1232.

**Bancroft, J.D., Cook, H.C.** 1994. Manual of histological techniques and their diagnostic application. Ed. *Churchill Livingstone* Edinburgh.

**Berlanga, J.J., Gualillo, O., Buteau, H., Applanat, M., Kelly, P.A., Edery, M.** 1997. Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J Biol Chem* 272 (4): 2050-2052.

**Bilezikian, J.p., Raisz, L.G., Rodan, G.A.** 1996. Principles of bone biology. Ed. *Academic Press*. San Diego.

**Blank, E.W., Wong, P.Y., Lakshmanaswamy, R., Guzman, R., Nandi, S.** 2008. Both ovarian hormones estrogen and progesterone are necessary for hormonal mammary carcinogenesis in ovariectomized ACI rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (9): 3527-3532.

**Bocelli-Tyndall, C., Bracci, L., Spagnoli, G., Braccini, M., Bouchenaki, M, Ceredig, R., Pistoia, V., Martin, I., Tyndall, A.** 2007. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy and autoimmune disease patients reduce the proliferation of autologous and allogeneic stimulated lymphocytes in vitro. *Rheumatology*. 46: 403-408.

**Brockman, J.L., Schroeder, M.D., Schuler L.A.** 2002. PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. *Mol Endocrinol* 16 (4): 774-784.

**Brown, R.J., Adams, J.J., Pelekanos, R.A., Wan, Y., McKinstry, K. Palethorpe W.J., Seeber, R.M., Monks, T.A., Eidne, K.A., Parker, M.W., Waters M.J.** 2005. Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol* 12 (9): 814-821.

**Caplan, A.I.** 1994. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21 (3): 429-435.

**Caplan, A.I.** 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217 (2): 318-324.

**Caplan, A.I., Dennis, J.E.** 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98 (5): 1076-1084.

**Chan, C.K., Liao, S., Li, B., Lareu, R.R., Larrick, J.W., Ramakrishna S., Raghunath M.** 2009. Early adhesive behavior of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on collagen electrospun fibers. *Biomed Mater* 4 (3): 035006.

**Clement-Lacroix, P., Ormandy, C., Lepescheux, L., Ammann, P., Damotte, D., Goffin, V., Bouchard, B., Amling, M., Gaillard-Kelly, M., Binart, N., Baron, R., Kelly, P.A.** 1999. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology* 140 (1): 96-105.

**Clevenger, C.M., Parker Jones, P., Tanaka, H., Seals, D.R., DeSouza, C.A.** 2002. Decline in insulin action with age in endurance-trained humans. *J Appl Physiol* 93 (6): 2105-2111.

**Clevenger, C.V.** 2003a. Nuclear localization and function of polypeptide ligands and their receptors: a new paradigm for hormone specificity within the mammary gland? *Breast Cancer Res* 5 (4): 181-187.

**Clevenger, C.V.** 2003b. Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer. *Breast Dis* 18: 75-86.

**Clevenger, C.V., Gadd, S.L., Zheng, J.** 2009. New mechanisms for PRLR action in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 20 (5): 223-229.

**Couse, J.f., Korach, K.S.** 1999 estrogen receptor Null Mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 20 (8): 358-417.

**Crigler, L., Robey, R.C., Asawachaicharn, A., Gaupp, D., Phinney, D.G.** 2006. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol* 198 (1): 54-64.

**Dhasarathy, A., Kajita, M., Wade, P.A.** 2007. The transcription factor snail mediates epithelial to mesenchymal transitions by repression of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 21 (12): 2907-2918.



Du, Y., Fischer, T.Z., Lee, L.N., Lercher, L.D., Dreyfus, C.F. 2003. Regionally specific effects of BDNF on oligodendrocytes. *Dev Neurosci* 25 (2-4): 116-126.

Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T, Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., Karsenty G. 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100 (2): 197-207.

Fernandez-Galaz, C., Fernandez-Agullo, T., Perez, C., Peralta, S., Arribas, C., Andres A., Carrascosa, J.M., Ros, M. 2002. Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia* 45 (7): 997-1003.

Friedenstein, A. 1989. Stromal-Hematopoietic Interrelationships: Maximov's Ideas and Modern Models. *Haematology and Blood Transfusion* 32: 159-167.

Gadd, S.L., Clevenger, C.V. 2006. Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Mol Endocrinol* 20 (11): 2734-2746.

Garimella, R., Bi, X., Camacho, N. Sipe, J.b., Anderson H.C. 2004. Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization. *Bone* 34 (6): 961-970

Giguère, V., Tremblay, A., Tremblay G.B. 1998. Estrogen receptor  $\beta$ : Re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids*. 63: 355-339

Gong, H., Jarzynka, M.J., Cole, T.J., Lee, J.H., Wada, T., Zhang, B., Gao, J., Song, W.H., DeFranco D.B. Cheng, S.Y., Xie, W. 2008. Glucocorticoids antagonize estrogens by glucocorticoid receptor-mediated activation of estrogen sulfotransferase. *Cancer Res*. 68 (18) 7386-7393.

Grellier, M., Bordenave, L., Amedee, J. 2009. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 27 (10): 562-571.

Gundersen, H.J.G., Bendtsen, T.F., Korbo, L. Marcussen, N. Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B. Sorensen, F.B., Vesterby, A., West, M.J.1988. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 96: 379-394

Hall, BK. 2005. Bone and Cartilage. Developmental and Evolutionary Skeletal Biology. Ed. Elsevier Academic Press San Diego.

Hall, J.M., Couse, J.F., Korach, K.S. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276 (40): 36869-36872.

- Han, S.J., Lonard, D.M., O'Malley, B.W.** 2009. Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab* 20 (1): 8-15.
- Haniffa, M.A., Wang, X.N., Holtick, U., Rae, M., Isaacs, J.D., Dickinson, A.M., Hilkens, C.M., Collin, M.P.** 2007. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol* 179 (3): 1595-1604.
- He, K., Wang, X., Jiang, J., Guan, R., Bernstein, K.E., Sayeski, P.P., Frank, S.J.** 2003. Janus kinase 2 determinants for growth hormone receptor association, surface assembly, and signaling. *Mol Endocrinol* 17 (11): 2211-2227.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parker, M.G.** 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387 (6634): 733-736.
- Javed, A., Guo, B., Hiebert, S., Choi, J.Y., Green, J., Zhao, S.C., Osborne, M.A., Stifani, S., Stein, J.L., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, G.S.** 2000. Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J Cell Sci* 113 ( Pt 12): 2221-2231.
- Jiang, H., Patel, P.H., Kohlmaier, A., Grenley, M.O., McEwen, D.G., Edgar, B.A.** 2009. Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* 137 (7): 1343-1355.
- Jones, S., Horwood, N., Cope, A., Dazzi, F.** 2007. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol* 179 (5): 2824-2831.
- Karsenty, G.** 1999. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 13 (23): 3037-3051.
- Karsenty, G.** 2006a. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* 4 (5): 341-348.
- Karsenty, G., Ducy, P.** 2006b. The hypothalamic control of bone mass, implication for the treatment of osteoporosis. *Ann Endocrinol (Paris)* 67 (2): 123.
- Kline, J.B., Roehrs, H., Clevenger, C.V.** 1999. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* 274 (50): 35461-35468.
- Kline, J.B., Rycyzyn, M.A., Clevenger, C.V.** 2002. Characterization of a novel and functional human prolactin receptor isoform (deltaS1PRLR) containing only one extracellular fibronectin-like domain. *Mol Endocrinol* 16 (10): 2310-2322.

**Lazowski, D.A., Fraher, L.J., Hodzman, A., Steer, B., Modrowski, D., Han, V.K.** 1994. Regional variation of insulin-like growth factor-I gene expression in mature rat bone and cartilage. *Bone* 15 (5): 563-576.

**Lennon DP HS, Bruder SP, Jaiswasl N, Caplan AI.** 1996. Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identification of serum for optimal selection and proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol* 32:602-611

**Linker, C.A., Damon, L.E., Ries, C.A., Navarro, W.A., Case, D., Wolf, J.L.** 2002. Autologous stem cell transplantation for advanced acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 29 (4): 297-301.

**Lu, K.P., Zhou X.Z.** 2007. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (11): 904-916.

**Meirelles Lda, S., Fontes, A.M., Covas, D.T., Caplan, A.I.** 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20 (5-6): 419-427.

**Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Kremer, L., von Kobbe, C., de Ana, A.M., Merida, I., Martinez, A.C.** 1997. Conformational changes required in the human growth hormone receptor for growth hormone signaling. *J Biol Chem* 272 (14): 9189-9196.

**Micchelli, C.A., Perrimon N.** 2006. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 439 (7075): 475-479.

**Miralles-Flores C, Delgado-Baeza, E.** 1990. Histomorphometric differences between the lateral region and central region of the growth plate in fifteen day old rats. *Acta Anat.* 139: 209-213.

**Ogueta, S., Munoz, J., Obregon, E., Delgado-Baeza, E., Garcia-Ruiz, J.P.** 2002. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 190 (1-2): 51-63.

**Olazabal, I.M., Munoz, J.A., Rodriguez-Navas, C., Alvarez, L., Delgado-Baeza, E., Garcia-Ruiz J.P.** 2009. Prolactin's role in the early stages of liver regeneration in rats. *J Cell Physiol* 219 (3): 626-633.

**Ormandy, C.J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N., Kelly, P.A.** 1997a. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 11 (2): 167-178.

**Ormandy, C.J., Hall, R.E., Manning, D.L., Robertson, J.F., Blamey, R.W., Kelly, P.A., Nicholson, R.I., Sutherland, R.L.** 1997b. Coexpression and cross-regulation

of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (11): 3692-3699.

**Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R.** 1987. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2 (6): 595-610.

**Pisati, F., Belicchi, M., Acerbi, F., Marchesi, C., Giussani, C., Gavina, M., Javerzat, S., Hagedorn, M., Carrabba, G., Lucini, V., Gaini, S.M., Bresolin, N., Bello, L., Bikfalvi, A., Torrente, Y.** 2007. Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models. *Cancer Res* 67 (7): 3054-3063.

**Plotnikov, A., Varghese, B., Tran, T.H., Liu, C., Rui, H., Fuchs, S.Y.** 2009. Impaired turnover of prolactin receptor contributes to transformation of human breast cells. *Cancer Res* 69 (7): 3165-3172.

**Qazi, A.M., Tsai-Morris, C.H., Dufau, M.L.** 2006. Ligand-independent homo- and heterodimerization of human prolactin receptor variants: inhibitory action of the short forms by heterodimerization. *Mol Endocrinol* 20 (8): 1912-1923.

**Rhen, T., Grissom, S., Afshati, C., Cidlowski, J.A.** 2003 Dexamethasone blocks the rapid biological effects of 17 $\beta$ -estradiol in the rat uterus without antagonizing its global genomic actions. *FASEB J* 17:1849-1870.

**Riggs, B.L., Khosla, S., Melton, 3rd. L.J.** 2002. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23 (3): 279-302.

**Romero-Prado, M., Blazquez, C., Rodriguez-Navas, C., Munoz, J., Guerrero, I., Delgado-Baeza, E., Garcia-Ruiz, J.P.** 2006. Functional characterization of human mesenchymal stem cells that maintain osteochondral fates. *J Cell Biochem* 98 (6): 1457-1470.

**Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., Glass, C.K.** 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20 (11): 1405-1428.

**Rycyzyn, M.A., Reilly, S.C., O'Malley, K., Clevenger, C.V.** 2000. Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol Endocrinol* 14 (8): 1175-1186.

**Sadler, TW.** 2004. Langman Embriología médica. 9ª Edición Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

**Sahlin, L.** 1995. Dexamethasone attenuates the estradiol-induced increase of IGF-I mRNA in rat uterus. *Steroid Biochem. Molec. Biol* 55 (1): 9-15.

**Sakamoto, K., Creamer, B.A., Triplett, A.A., Wagner, K.U.** 2007. The Janus kinase 2 is required for expression and nuclear accumulation of cyclin D1 in proliferating mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 21 (8): 1877-1892.

**Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D.G., Hamm, C.W., Suselbeck, T., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S., Zeiher, A.M.** 2006a. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355 (12): 1210-1221.

**Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D.G., Hamm, C.W., Suselbeck, T., Werner, N., Haase, J., Neuzner, J., Germing, A., Mark, B., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S., Zeiher, A.M.** 2006b. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 27 (23): 2775-2783.

**Seubert, N., Royer, Y., Staerk, J., Kubatzky, K.F., Moucadel, V., Krishnakumar, S., Smith, S.O., Constantinescu, S.N.** 2003. Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol Cell* 12 (5): 1239-1250.

**Smirnov, A.N.** 2002. Nuclear Receptors: Nomenclature, Ligands, Mechanisms of their effects on gene expression. *Biochem (Moscow)* 67 (9): 957-977.

**Takeda, S., Eleftheriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducey, P., Karsenty, G.** 2002. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111 (3): 305-317.

**Tang, W., Li, Y., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Spiegelman, V.S., Fuchs, S.Y.** 2005. *Cancer Res* 65 (5): 1904-1908.

**Tashiro, H., Fukuda, Y., Kimura, A., Hoshino, S., Sakaguchi, T., Furukawa, M., Shintaku, S., Dhohi, R.** 1994. Monitoring for rejection and engraftment by means of the polymerase chain reaction after rat orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 58 (6) 745-748.

**Tavassoli, M., Crosby W.H.** 1968. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* 161 (836): 54-56.

**Tavassoli, M., Weiss, L.** 1971. The structure of developing bone marrow sinuses in extramedullary autotransplant of the marrow in rats. *Anat Rec* 171 (4): 477-494.

**Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A.** 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139 (5): 871-890.

**Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., Chambon, P.** 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59 (3): 477-487.

**Tyndall, A., Walker, U.A., Cope, A., Dazzi, F., De Bari, C., Fibbe, W., Guiducci, S., Jones, S., Jorgensen, C., Le Blanc, K., Luyten, F., McGonagle, D., Martin, I., Bocelli-Tyndall, C., Pennesi, G., Pistoia, V., Pitzalis, C., Uccelli, A., Wulffraat, N., Feldmann, M.** 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis Res Ther* 9 (1): 301.

**Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V.** 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8 (9): 726-736.

**Xie, J., LeBaron, M.J., Nevalainen, M.T., Rui, H.** 2002. Role of tyrosine kinase Jak2 in prolactin-induced differentiation and growth of mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 277 (16): 14020-14030.

**Yang, N., Wang, X., Jiang, J., Frank, S.J.** 2007. Role of the growth hormone (GH) receptor transmembrane domain in receptor predimerization and GH-induced activation. *Mol Endocrinol* 21 (7): 1642-1655.

**Zheng, J., Koblinski, J.E., Dutson, L.V., Feeney, Y.B., Clevenger, C.V.** 2008. Prolyl isomerase cyclophilin A regulation of Janus-activated kinase 2 and the progression of human breast cancer. *Cancer Res* 68 (19): 7769-7778.

## **8 ANEXO**

## 8.1 PARÁMETROS ESTEREOLÓGICOS TRABECULARES

Parámetro	Fórmula	
LT	Longitud de la trabécula (mm) $LT = \frac{\pi}{2} \times PT \times d = 18 \times \pi \times d$	a: área asociada con cada punto (mm <sup>2</sup> ) AT = PT a: área total del test (mm <sup>3</sup> ) d: distancia entre puntos de un objeto del espacio (mm)
MTW	Anchura de de las trabéculas $MTW = \frac{h_{TB}}{\Sigma i} \cdot 2d$	$h_{TB}$ = total de muestras mineralizadas i = total intersecciones en el perímetro estereológico d = distancia entre puntos de un objeto del espacio (mm)
MMCL	Distancia intratrabecular $MMCL = \frac{h_V}{\Sigma i} \cdot \pi d$	$h_V$ = total muestras de médula ósea (vacío) i = total intersecciones en el perímetro estereológico d = distancia entre puntos de un objeto del espacio (mm)

## TRABÉCULAS EPIFISARIAS

**Tabla s-1.** Trabéculas Epifisarias. Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis semanas de evolución

Parámetro	Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
LT	1,31 ± 0,21	0,11 ± 0,05 (*)	0,64 ± 0,12 (*)
MTW	100 ± 17	42 ± 10 (*)	83 ± 16
MMCL	198 ± 43	497 ± 19 (*)	567 ± 84 (*)

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6;  $L_T$ - longitud total (mm); MTW- anchura de perfil trabecular (µm); MMCL- distancia intratrabecular (µm);  $\bar{X}$ - Media; DS- Desviación Estándar; (\*)- p<0,05.

**Tabla s-2. Trabéculas Epifisarias.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis meses de evolución.

Parámetro	Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
$L_T$	1,56 ± 0,17	0,78 ± 0,07 (*)	1,34 ± 0,47
MTW	131 ± 9	69 ± 6 (*)	148 ± 22
MMCL	256 ± 21	427 ± 42 (*)	289 ± 51

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6;  $L_T$ - longitud total (mm); MTW- anchura de perfil trabecular (µm); MMCL- distancia intratrabecular (µm);  $\bar{X}$ - Media; DS-Desviación Estándar; (\*)- p<0,05.



## TRABÉCULAS METAFISARIAS

**Tabla s-3. Trabéculas Metafisarias Centrales.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis semanas de evolución

Parámetro	Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
L <sub>T</sub>	1,27 ± 0,088	0,48 ± 0,098 (*)	0,4 ± 0,2 (*)
MTW	82 ± 10	48 ± 5 (*)	50 ± 6 (*)
MMCL	204 ± 34	462 ± 72 (*)	690 ± 146 (*)

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; L<sub>T</sub>- longitud total (mm); MTW- anchura de perfil trabecular (µm); MMCL- distancia intratrabecular (µm);  $\bar{X}$ - Media; DS- Desviación Estándar; (\*)- p<0,05.

**Tabla s-4. Trabéculas Metafisarias marginales.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis semanas de evolución.

Parámetro	Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
L <sub>T</sub>	1,15 ± 0,15	0,51 ± 0,11 (*)	0,58 ± 0,12 (*)
MTW	75 ± 22	31 ± 5 (*)	39 ± 7 (*)
MMCL	186 ± 24	504 ± 109 (*)	560 ± 77 (*)

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; L<sub>T</sub>- longitud total (mm); MTW- anchura de perfil trabecular (µm); MMCL- distancia intratrabecular (µm);  $\bar{X}$ - Media; DS- Desviación Estándar; (\*)- p<0,05.

**Tabla s-5. Trabéculas Metafisarias marginales.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis meses de evolución.

Parámetro	Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
L <sub>T</sub>	1,17 ± 0,19	---	1,18 ± 0,15
MTW	51 ± 11	---	60 ± 13
MMCL	224 ± 23	---	139 ± 10 (*)

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; L<sub>T</sub>- longitud total (mm); MTW- anchura de perfil trabecular (µm); MMCL- distancia intratrabecular (µm);  $\bar{X}$ - Media; DS- Desviación Estándar; (\*)- p<0,05; (---)- indica ausencia de trabéculas en el corte histológico.

## 8.2 PARÁMETROS ESTEREOLÓGICOS CELULARES

Parámetro	Fórmula	
Nv Densidad numérica, celularidad o número de células por unidad de volumen (mm <sup>3</sup> )	$Nv = (P/A) h^{-1} M^{-2} (\sum Ni / \sum Pi)$	(P/A) = 1/10 <sup>2</sup> mm <sup>2</sup> (valor constante) h-1 1/6 μm <sup>-1</sup> = 1/0,006 mm <sup>-1</sup> (1000 μm = 1mm ) (h = 6 μm- grosor del corte del microtomo). M2 = magnificación (55 x 40) <sup>2</sup> . La pantalla del monitor aumenta 55 veces y el ocular micrométrico utilizado fue de 10x, con el objetivo de 40x. (P/A) h-1 M2 = 8066666 mm <sup>-3</sup> ∑N i = Número de células nucleadas contadas ∑Pi = Número de puntos por zona
Frv Densidad celular, fracción de volumen celular o volumen que ocupan las células en la estructura.		Frv- Número de puntos en células nucleadas /Número de puntos por zona
Vc Volumen celular medio	$Vc = Frv/Nv$	

## OSTEOCITOS DE TRABÉCULAS ÓSEAS

**Tabla s-6. Osteocitos de trabéculas óseas.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis semanas de evolución.

Zona / Parámetro		Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
Trabécula epifisaria	Nv	224203 ± 38759	99953 ± 37140 (*)	214698 ± 57844
	Frv	1,5 ± 0,3	0,68 ± 0,21 (*)	8,53 ± 10,06
	Vc	87 ± 26	86 ± 14	78 ± 3
Trabécula metafisaria marginal	Nv	263821 ± 23604	110619 ± 8221 (*)	452768 ± 148358 (*)
	Frv	18,2 ± 0,26	0,53 ± 0,13 (*)	1,82 ± 0,26
	Vc	92 ± 6	60 ± 11 (*)	71 ± 13 (*)
Trabécula metafisaria central	Nv	204770 ± 9849	49411 ± 19575 (*)	217843 ± 44232
	Frv	1,59 ± 0,21	0,50 ± 0,06 (*)	1,31 ± 0,28
	Vc	112 ± 36	69 ± 10 (*)	74 ± 4

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; Nv- Número de células por unidad de volumen (mm<sup>3</sup>); Frv-Fracción de volumen celular (%); Vc-Volumen celular medio (μm<sup>3</sup>);  $\bar{X}$ - Media; DS- Desviación Estándar; (\*)- p<0,05

**Tabla s-7. Osteocitos de trabéculas óseas.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis meses de evolución.

Zona / Parámetro		Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
Trabécula epifisaria	Nv	230886 ± 26549	134087 ± 25817 (*)	305886 ± 26549
	Frv	1,55 ± 0,31	1,23 ± 0,62	2,28 ± 0,81
	Vc	96 ± 4	87 ± 8	79 ± 13 (*)
Trabécula metafisarias marginal	Nv	286495 ± 96235	NC	333897 ± 26620
	Frv	2,85 ± 0,73	NC	4,54 ± 3,28
	Vc	140 ± 39	NC	97 ± 14
Trabécula metafisarias central	Nv	---	---	---
	Frv	---	---	---
	Vc	---	---	---

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; Nv- Número de células por unidad de volumen ( $\text{mm}^3$ ); Frv-Fracción de volumen celular (%); Vc-Volumen celular medio ( $\mu\text{m}^3$ );  $\bar{X}$ - Media; DS-Desviación Estándar; (\*)- p<0,05; (---)- indica datos no recogidos en el corte histológico. NC-No Cuantificado.

## OSTEOCITOS EN HUESO SUPRAPLACA, CORTICAL Y PERIOSTIO

**Tabla s-8. Celularidad en Hueso supraplaca, Cortical y Periostio.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis semanas de evolución.

Zona / Parámetro		Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
Hueso supraplaca	Nv	216948 ± 50629	109955 ± 26808 (*)	241937 ± 42956
	Frv	1,57 ± 0,25	0,95 ± 0,19 (*)	1,4 ± 0,13
	Vc	97 ± 15	82 ± 4	98 ± 18
Cortical	Nv	217535 ± 10443	109331 ± 59106 (*)	202430 ± 38565
	Frv	1,72 ± 0,03	0,97 ± 0,56 (*)	1,4 ± 0,34
	Vc	92 ± 14	101 ± 26 (*)	78 ± 3 (*)
Periostio	Nv	578660 ± 72288	213510 ± 114658	692924 ± 118352
	Frv	3,25 ± 0,29	12,66 ± 0,67 (*)	4,19 ± 1,36
	Vc	59 ± 3	45 ± 6	56 ± 10

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; Nv- Número de células por unidad de volumen ( $\text{mm}^3$ ); Frv-Fracción de volumen celular (%); Vc-Volumen celular medio ( $\mu\text{m}^3$ );  $\bar{X}$ - Media; DS-Desviación Estándar; (\*)- p<0,05

**Tabla s-9. Celularidad en Hueso supraplaca, Cortical y Periostio.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis meses de evolución.

Zona / Parámetro		Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
H.supraplaca	Nv	204815 ± 26275	108091 ± 47247 (*)	178740 ± 42400
	Frv	2,53 ± 0,71	1,22 ± 0,18 (*)	2 ± 0,79
	Vc	102 ± 28	95 ± 9	90 ± 12
Cortical	Nv	202269 ± 17052	149139 ± 30444 (*)	204430 ± 38565
	Frv	6,18 ± 4,98	14,8 ± 12,1	8,05 ± 2,69
	Vc	80 ± 5	76 ± 11	90 ± 5
Periostio	Nv	1737693 ± 715147	661548 ± 142552 (*)	1039280 ± 394963
	Frv	6,17 ± 4,97	14,81 ± 12,12	8,05 ± 2,69
	Vc	51 ± 8	52 ± 10	72 ± 19

Prueba estadística U-test de Mann-Whitney. Número de casos n=6; Nv- Número de células por unidad de volumen ( $\text{mm}^3$ ); Frv-Fracción de volumen celular (%); Vc-Volumen celular medio ( $\mu\text{m}^3$ );  $\bar{X}$ - Media; DS-Desviación Estándar; (\*)- p<0,05

## CONDROCITOS EN LA PLACA DE CRECIMIENTO

**Tabla s-10. Placa de Crecimiento.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis semanas de evolución.

Zona / Parámetro		Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
Germinativo	Nv	375576 ± 43658	68501 ± 15133 (*)	414738 ± 113251
	Frv	5,38 ± 0,29	6,59 ± 0,16 (*)	4,6 ± 0,89
	Vc	156 ± 6	83 ± 9 (*)	108 ± 27 (*)
Proliferativo	Nv	721643 ± 64404	226599 ± 49543 (*)	569229 ± 113761 (*)
	Frv	1,63 ± 0,50	1,96 ± 0,4	4,45 ± 1,43
	Vc	183 ± 24	85,83 ± 7 (*)	155 ± 34
Hipertrófico	Nv	477597 ± 59587	179883 ± 24707 (*)	370210 ± 47638 (*)
	Frv	20,88 ± 0,54	5,16 ± 1,18 (*)	7,08 ± 1,03 (*)
	Vc	439 ± 73	296 ± 19 (*)	370 ± 94

Prueba estadística U-test de Mann-Whitney. Número de casos n=6; Nv- Número de células por unidad de volumen ( $\text{mm}^3$ ); Frv-Fracción de volumen celular (%); Vc-Volumen celular medio ( $\mu\text{m}^3$ );  $\bar{X}$ - Media; DS-Desviación Estándar; (\*)- p<0,05

**Tabla s-11. Placa de Crecimiento.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis meses de evolución.

Zona / Parámetro		Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
Germinativo	Nv	297708 ± 65728	126477 ± 48762 (*)	335122 ± 125310
	Frv	2,76 ± 0,75	1,68 ± 1,14 (*)	2,52 ± 1,02
	Vc	92 ± 20	84 ± 2	120 ± 35
Proliferativo	Nv	422488 ± 91929	117270 ± 64225 (*)	538015 ± 133903
	Frv	4,2 ± 1,19	1,66 ± 1,05 (*)	12,75 ± 10,65
	Vc	118 ± 12	94 ± 54	152,33 ± 52,45
Hipertrófico	Nv	234158 ± 31527	136500 ± 9385 (*)	410071 ± 82678 (*)
	Frv	7,58 ± 1,47	3,92 ± 0,36 (*)	5,27 ± 2,12 (*)
	Vc	230 ± 63	261 ± 55	408 ± 60

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; Nv- Número de células por unidad de volumen (mm<sup>3</sup>); Frv-Fracción de volumen celular (%); Vc-Volumen celular medio (μm<sup>3</sup>);  $\bar{X}$ - Media; DS-Desviación Estándar; (\*)- p<0,05

### PLACA DE CRECIMIENTO: OSTEOCLASTOS EN LA ZONA CONDROMETAFISARIA

**Tabla s-12. Osteoclastos.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis semanas de evolución.

Célula / Parámetro		Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
Clasto	Nv	80578 ± 43743	69491 ± 68930 (*)	65995 ± 14097 (*)
	Frv	7,03 ± 0,82	2,26 ± 0,42 (*)	4,76 ± 0,78
	Vc	785 ± 98	459 ± 47 (*)	540 ± 122 (*)

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; Nv- Número de células por unidad de volumen (mm<sup>3</sup>); Frv-Fracción de volumen celular (%); Vc-Volumen celular medio (μm<sup>3</sup>);  $\bar{X}$ - Media; DS-Desviación Estándar; (\*)- p<0,05

**Tabla s-13. Osteoclastos.** Comparación de los Grupos ensayos con el grupo control. Seis meses de evolución.

Célula / Parámetro		Grupo Control	Grupo OVX	Grupo OVX+MSC
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
Clasto	Nv	118908 ± 176094	61727 ± 12379 (*)	90408 ± 43541
	Frv	4,16 ± 0,33	1,78 ± 0,65	10,92 ± 3,61 (*)
	Vc	700 ± 57	592 ± 64	957 ± 194 (*)

Prueba estadística U-test de Mann-Withney. Número de casos n=6; Nv- Número de células por unidad de volumen (mm<sup>3</sup>); Frv-Fracción de volumen celular (%); Vc-Volumen celular medio (μm<sup>3</sup>);  $\bar{X}$ - Media; DS-Desviación Estándar; (\*)- p<0,05