

Master en Ciencias Odontológicas

Trabajo fin de Master



**Evaluación de los niveles de
osteocalcina, osteopontina y
osteoprotegerina en cultivos de
células madre mesenquimales de
diversos orígenes: estudio piloto**

Autor: Carlos Pascual Atienza
Tutor: Prof. Luis Blanco Jerez

Índice

Introducción.....	Pág. 3
Justificación.....	Pág. 7
Hipótesis de trabajo.....	Pág. 8
Objetivos.....	Pág. 8
Ética.....	Pág. 9
Material y método.....	Pág. 9
Resultados	Pág. 13
Discusión.....	Pág. 18
Conclusión.....	Pág. 23
Bibliografía.....	Pág. 25

Introducción

El conocimiento en la bioingeniería tisular para lograr regenerar un tejido después de una lesión o de un daño causado por un ataque bacteriano ha llevado a la identificación y aislamiento de poblaciones de células progenitoras que bajo estímulos específicos pueden diferenciarse en una población determinada, recibiendo el nombre de células madre. Son células clonogénicas capaces de autorrenovación; es decir son células no especializadas que se renuevan durante largos periodos de tiempo por división celular; y son capaces de diferenciarse a distintas líneas celulares; esto hace referencia a que pueden ser inducidas por un estímulo adecuado a diferenciarse a células con funciones especiales como miocitos, osteoblastos, adipocitos, condroblastos, etc.¹

Las células madre fueron aisladas inicialmente en médula ósea por Friedenstein y cols.² Posteriormente a partir de distintos tejidos adultos: tejido adiposo, piel, retina, etc. Con referencia al área dental, hace años que se pueden aislar de pulpa de diente definitivo y temporal, así como de ligamento periodontal.

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) las células madre mesenquimales (CMM) se definen sobre la base de tres características principales: (1) su adhesión a plásticos, (2) la expresión de un conjunto específico de epítomos de membrana (por ejemplo: CD73, CD90, CD105), junto con la falta de expresión de los marcadores hematopoyéticos (por ejemplo: CD14, CD34, y CD45) y el antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR), y (3) su capacidad de diferenciarse en linajes de

osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Otras características incluyen su autorrenovación e hipoinmunogenicidad, haciéndolos hipotéticamente aptos para el trasplante alogénico, y su capacidad de producir inmunosupresión del trasplante.³

En los últimos años, la terapia celular y la ingeniería tisular basada en células madre mesenquimales han adquirido una gran importancia en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas al tratamiento de diversas patologías del sistema esquelético. Sin embargo, aún son muchas las preguntas sin respuesta que acompañan a este tipo de técnicas.⁴

En el proceso de regeneración ósea se han considerado como importantes, entre otras, tres proteínas: osteocalcina, osteopontina y osteoprotegerina, que pueden ser de gran interés para la correcta comprensión de la formación del hueso. Su mayor o menor presencia en los cultivos celulares puede ayudarnos a comprender los mecanismos de formación de hueso y la capacidad de esos cultivos para generar hueso.

La osteocalcina (OC), también conocida como "bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein (BGP)", es la proteína no colágena más abundante de la matriz ósea y se caracteriza por ser "vitamina K-dependiente".⁵

Aunque la OC es liberada por los osteoblastos durante la formación de hueso y se une con la matriz ósea mineralizada, su función precisa en el metabolismo óseo no ha sido completamente aclarada. Diversos estudios experimentales han demostrado que la OC promueve el reclutamiento y la diferenciación de los monocitos y

precursores de osteoclastos circulantes, lo que sugiere su papel en la interacción osteoblasto-osteoclasto, regulando así la destrucción y formación ósea.^{6, 7, 8}

La osteopontina (OP) es una glicoproteína secretada por una variedad de tejidos, incluyendo el hueso, tejidos dentales, renales y vasculares. No obstante, son sintetizadas y secretadas predominantemente por osteoblastos y osteocitos y está asociada con la remodelación ósea.⁹ Participan en una amplia variedad de procesos celulares, tales como la arterosclerosis, remodelación ósea o la angiogénesis. La OP se expresa también por muchos tipos de tumores, incluyendo cáncer de mama, de pulmón, gástrico, hepático, colon y carcinomas de próstata. Además de todo ello, la OP es capaz de reclutar macrófagos y neutrófilos y, como se ha mencionado en numerosos estudios, la capacidad de promover la progresión de un proceso tumoral.¹⁰

OP es una importante citoquina proinflamatoria que ha sido fuertemente vinculada a muchas enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico.¹¹

La osteoprotegerina (OPG) es una proteína producida, sobre todo, por osteoblastos, células endoteliales vasculares y células del músculo liso. Pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral.^{12, 13, 14} Tiene un efecto “anti-osteoclástico” al ser un receptor señuelo para el activador de osteoclastos RANKL. Por otro lado, parece ser un importante regulador de la calcificación vascular y muy importante para mantener la masa ósea.^{12, 15, 16} Además el tratamiento con células madre mesenquimales con OPG para la remodelación ósea conllevan una mayor expresión de

osteocalcina y mayor producción de depósitos de calcio en la zona a remodelar en comparación con las células mesenquimales control sin OPG.¹⁷

Clínicamente, la OPG puede desempeñar un papel en el desarrollo de la osteoporosis, enfermedades óseas inflamatorias y eventos de resorción ósea. Además, la OPG se ha asociado con la presencia y la gravedad de las enfermedades cardiovasculares.¹³

Como queda remarcado las proteínas OC, OP y OPG, segregadas fundamentalmente por osteoblastos, son esenciales y desempeñan un papel fundamental para la formación ósea. Por lo que su mayor presencia en el foco donde se produce regeneración ósea puede ser indicativa de una regeneración más eficaz. En cambio, niveles bajos de dichas proteínas pueden suponer una deficiente regeneración ósea.

Clásicamente se ha realizado el análisis de proteínas mediante ELISA o RIA. En la actualidad, cuando queremos medir varias proteínas simultáneamente tenemos disponible el sistema Luminex™ que permite mediante un sistema basado en la citometría de flujo unir en una serie de esferas de poliestireno, anticuerpos marcados frente a las proteínas a analizar. Esto permite que en una sola lectura de las esferas, el lector actúe de forma similar a lo que en una citometría de flujo sería un marcaje múltiple. Siendo una metodología absolutamente novedosa.

Justificación

En los últimos años, el avance en terapia celular ha supuesto un gran paso para las técnicas de regeneración ósea, tanto es así, que a día de hoy son numerosos los trabajos publicados sobre estos temas y el elevado número de investigaciones que se han hecho y se siguen haciendo sobre ello.^{18, 19, 20, 21} Pese a que se ha avanzado mucho en el tema, a día de hoy no se conoce cuales son los cultivos celulares idóneos para la regeneración ósea.

Como el objetivo general del grupo de trabajo es la regeneración ósea, sería interesante determinar si el distinto origen tisular de las células madre condiciona o puede condicionar su capacidad de formación de tejido óseo. Por otra parte, no podemos olvidar que en realidad trabajamos no con cultivos monoclonales sino con cultivos primarios que si bien cumplen como conjunto los criterios de definición de las células madre en cuanto a su expresión de epítomos (CD) y su capacidad de diferenciación, no podemos asegurar que todas y cada una de sus células cumplan todos los criterios y por tanto estamos trabajando con poblaciones mixtas. Aunque si que cumplen los criterios como grupo celular.

Nuestra intención sería determinar cuál de estas poblaciones mixtas de relativa fácil obtención y aplicación clínica sería preferible en regeneración ósea.

Como hemos indicado antes, elevados niveles de osteocalcina, osteopontina y osteoprotegerina son indicadores de regeneración ósea. Es por ello que el propósito

de este estudio es determinar qué cultivos celulares tienen mayores niveles de las tres proteínas antedichas y poder determinar, con más estudios posteriores, cuales son los cultivos de células madre mejor preparados para la regeneración ósea.

Hipótesis de trabajo

Los cultivos de células madre mesenquimales de distinto origen expresan distintos niveles de osteocalcina, osteopontina y osteoprotegerina.

Objetivos

Como ya es sabido, una de las principales aplicaciones clínicas de las células madre mesenquimales consiste en la reparación de hueso, demostrado in vivo en conejos, ratones y en perros con defectos cráneo-faciales y defectos de huesos largos mediante la administración directa de células madre mesenquimales.^{22, 23, 24}

No obstante, hay una gran variedad de procedencias de las células madre mesenquimales, suponemos que cada una con diferente potencial para regeneración ósea rápida y eficaz. Es por ello que creemos conveniente comparar distintos cultivos celulares de células madre y poder determinar cuál o cuáles podrían ser las idóneas para la utilización en técnicas de regeneración ósea.

Por ello, hemos analizado la presencia en el medio de cultivo de células madre mesenquimales procedentes de distintas zonas del organismo la presencia de OC, OP y OPG.

Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Determinar los niveles de osteocalcina, osteopontina y osteoprotegerina de cultivos celulares de diversos orígenes tisulares.
- 2) Comparar los niveles de osteocalcina, osteopontina y osteoprotegerina entre los diferentes tipos de cultivos celulares.

Ética

Se obtuvo autorización del Comité Ético del Hospital Clínico, que es nuestro centro de referencia, para la caracterización de estas líneas celulares.

Material y método

Cultivos celulares

- Dos cultivos de células madre procedentes de papila apical
- Dos cultivos de células madre procedentes de pulpa dental de diente temporal
- Un cultivo de células madre procedentes de pulpa dental de diente permanente

- Un cultivo de células MG-63, que son células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico
- Un cultivo comercial de células osteoblásticas humanas procedentes de hueso sano
- Cinco cultivos primarios de explantes óseos
- Un cultivo de células madre procedentes de cordón umbilical
- Un cultivo de células madre procedentes de tejido adiposo

Todos los cultivos excepto los osteoblastos comerciales y MG-63 fueron obtenidos en el laboratorio de ingeniería tisular de la Facultad de Odontología de la UCM por nuestro grupo de investigación.

También hemos realizado un control de los medios de cultivo utilizados, para descartar la posibilidad de administración exógena de las proteínas a analizar.

Sistema de análisis de muestras

Para este estudio se utilizó “Luminex 200™ System with MILLIPLEX® Analyst 5.1 Software, 40-013”. Luminex 200™ está basado en citometría de flujo y optimizado para analizar múltiples proteínas con una cantidad mínima de muestra necesaria. El sistema requiere de muestras de bajo volumen y es capaz de llevar a cabo la lectura de hasta 96 muestras simultáneamente, lo cual facilita en gran medida la recogida de datos para el estudio.

Además gracias a MILLIPLEX® Analyst 5.1 se pueden cuantificar varias proteínas en una sola muestra.

Por ello, el instrumento fue utilizado para medir en cada uno de los cultivos la concentración de cada una de las proteínas de interés: osteocalcina, osteopontina y osteoprotegerina.

En nuestro caso se utilizó el kit Human Bone Panel 3 plex, el cual permite la medición simultánea, entre otras, de las tres proteínas de interés: OC, OPG y OP. Permite un ensayo rápido, sensible y reproducible y solo son necesarios 25µL de muestra.

Metodología

Los distintos cultivos se mantuvieron con MEM reconstituido con 15% de suero fetal bovino (SFB), 1% de glutamina y 5% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). El medio procedente de cada cultivo al realizar el cambio cada tres días en cultivos semiconfluentes se congeló a -80°C para proceder a su análisis mediante el kit de MILLIPLEX® de OC, OP y OPN. Como no tenemos referencias de los niveles que podrían existir en las muestras analizadas, decidimos realizar una valoración por triplicado de cada muestra a concentración normal y una doble valoración del medio diluido al 50% en medio de mantenimiento. Además hemos realizado un control de los medios utilizados, tanto del medio de mantenimiento como de los medios de diferenciación adipogénica y osteogénica de la casa LONZA®

El kit está constituido por una placa de 96 pocillos. Se utilizan los primeros 20 pocillos para realizar una curva de referencia mediante los controles proporcionados por la casa comercial. (Figura 1) Y el resto para las muestras o medios utilizados.

La sistemática de trabajo consiste en: se añaden 200µL de Assay Buffer para hidratar la membrana base de la placa de ensayo y se retira el exceso mediante una máquina de vacío específica para el kit comercial. Posteriormente, se añaden en la placa: 25µL de Assay Buffer en todos los pocillos, 25µL de standar o control en sus pocillos correspondientes, 25µL de Assay Buffer en los pocillos de las muestras, 25µL de medio de cultivo en el Background, standar y control y 25µL de la muestra en los pocillos adecuados. Por último hay que añadir 25µL de Mixed Beads (esferas) en todos los pocillos.

Una vez tengamos lo antedicho, se incuba a 4º C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se retira el líquido mediante la máquina de vacío específica y se realizan tres lavados de la placa con 200µL de Wash Buffer. Se añaden 50µL de Detection Antibody en cada pocillo y se incuba durante una hora a temperatura ambiente en agitación. A continuación añadimos 50µL de Streptavidina-Ficoeritrina en cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se llevan a cabo tres lavados con 200µL de Wash Buffer aplicando vacío. Por último, se añaden 100µL de Sheath Fluid, que es un líquido específico para permitir la lectura posterior de Luminex 200™, en cada pocillo y se agita durante 5 minutos.

Para finalizar el proceso, se introduce la placa en Luminex 200™ y, tras 30-45 minutos, se obtiene la lectura.

Datatype: Location	Result Sample	OC (pg/ml)	OPG (pg/ml)	OPN (pg/ml)
1 (A1)	Background	N/A	N/A	N/A
2 (B1)	Background	N/A	N/A	N/A
3 (C1)	ST1	Invalid	2.72	82.82
4 (D1)	ST1	Invalid	1.62	ERROR
5 (E1)	ST2	88.41	7.92	161.96
6 (F1)	ST2	106.98	6.90	226.02
7 (G1)	ST3	424.34	39.18	740.40
8 (H1)	ST3	407.21	43.39	830.64
9 (A2)	ST4	1308.02	119.66	2956.21
10 (B2)	ST4	1457.42	135.32	3179.08
11 (C2)	ST5	6090.09	438.54	12160.15
12 (D2)	ST5	7866.51	562.46	13930.19
13 (E2)	ST6	21791.54	1967.77	42068.41
14 (F2)	ST6	27561.45	2676.74	53143.08
15 (G2)	ST7	85017.82	7664.26	226593.18
16 (H2)	ST7	121182.72	8751.43	195930.33
17 (A3)	CN1	537.24	51.77	1686.33
18 (B3)	CN1	Invalid	53.47	1723.27
19 (C3)	CN2	9999.29	841.63	25985.76
20 (D3)	CN2	8663.61	692.39	24253.09

Figura 1. Datos correspondientes a la curva de calibración o referencia.

Resultados

Se analizaron los medios utilizados en nuestros cultivos para descartar concentración alguna de las proteínas de estudio. No encontramos concentración

significativa de dichas proteínas en ninguno de los medios, con la excepción del valor de osteocalcina en medio de mantenimiento (obsérvese figura 2), el cual se ha considerado un error de lectura debido a que en algunos casos se pueden encontrar agrupación de las esferas correspondientes al sistema, obteniéndose así falsos positivos. (Figura 2)

		OC (pg/ml)	OPG (pg/ml)	OPN (pg/ml)
49 (A7)	medio adip	<97,656	<2,075	<48,828
50 (B7)	medio adip	99,51	<2,075	<48,828
51 (C7)	medio mant	141,21	<2,075	<48,828
52 (D7)	medio mant	<97,656	<2,075	<48,828
53 (E7)	medio osteo	<97,656	<2,075	<48,828
54 (F7)	medio osteo	<97,656	<2,075	<48,828

Figura 2. Datos correspondientes a los medios utilizados en los cultivos de interés.

Se recogieron dos datos de cada uno de los cultivos en medio diluido (explicado anteriormente), obteniendo en algunos casos los datos un poco dispares y tres datos de cada uno de los cultivos en medio sin diluir, es decir en concentración normal. Es por todo ello, que consideramos más oportuno comentar los datos obtenidos de los cultivos a concentración normal, puesto que en la mayoría de los casos los datos eran parecidos y se disponía de tres muestras por cada cultivo. Sin embargo, en el caso de la OPG en la mayor parte de los casos los niveles se encontraban por encima de la curva

de referencia, por lo que consideraremos también los datos obtenidos en el medio diluido. (Figuras 3 y 4)

Datatype: Location	Tipo celular	OC (pg/ml)	OPG (pg/ml)	OPN (pg/ml)
21 (E3)	papila 1	<97,66	4175,5	447,93
22 (F3)	papila 1	310,17	3926,68	544,42
23 (G3)	papila 2	<97,66	4025,24	<48.828
24 (H3)	papila 2	129,7	4020,38	<48.828
25 (A4)	temp 1	216,05	>8500	<48.828
26 (B4)	temp 1	141,21	>8500	<48.828
27 (C4)	temp 2	272,95	>8500	136,25
28 (D4)	temp 2	268,84	>8500	171,73
29 (E4)	adulta	240,28	8104,37	492,38
30 (F4)	adulta	125,88	>8500	454,38
31 (G4)	mg63	192,09	>8500	<48.828
32 (H4)	mg63	152,81	>8500	75,93
33 (A5)	osteoblastos	<97,66	1578,14	176,53
34 (B5)	osteoblastos	<97,66	1298,81	161,96
35 (C5)	explante 1	103,24	>8500	113,97
36 (D5)	explante 1	224,1	>8500	156,97
37 (E5)	explante 2	168,42	7615,03	75,93
38 (F5)	explante 2	240,28	8702,53	61,15
39 (G5)	explante 3	264,74	>8500	146,78
40 (H5)	explante 3	216,05	7942,82	102,05
41 (A6)	explante 4	92,09	6071,07	<48.828
42 (B6)	explante 4	200,05	6435,96	<48.828
43 (C6)	cordón	<97,66	5064,84	892,52
44 (D6)	cordón	176,27	5559,52	1046,9
45 (E6)	explante 5	306,01	>8500	108,09
46 (F6)	explante 5	489,16	>8500	89,44
47 (G6)	adiposo	145,07	>8500	156,97
48 (H6)	adiposo	277,06	>8500	136,25

Figura 3. Datos correspondientes a los cultivos diluidos en distintos medios.

55 (G7)	papila 1	145,07	5748,36	973,08
56 (H7)	papila 1	99,51	4718,54	1017,56
57 (A8)	papila 1	<97,66	6137,91	895,07
58 (B8)	papila 2	103,24	>8500	<48.828
59 (C8)	papila 2	240,28	>8500	ERROR
60 (D8)	papila 2	129,7	8287,6	<48.828
61 (E8)	temp 1	200,05	>8500	102,05
62 (F8)	temp 1	114,51	>8500	44,38
63 (G8)	temp 1	172,34	>8500	75,93
64 (H8)	temp 2	<97,66	>8500	208,63
65 (A9)	temp 2	<97,66	>8500	204,18
66 (B9)	temp 2	<97,66	>8500	221,73
67 (C9)	adulta	176,27	>8500	948,13
68 (D9)	adulta	<97,66	>8500	793,88
69 (E9)	adulta	232,17	>8500	933,06
70 (F9)	mg63	240,28	>8500	23,52
71 (G9)	mg63	92,09	>8500	23,52
72 (H9)	mg63	129,7	>8500	61,15
73 (A10)	osteoblastos	<97,66	3204,31	302,11
74 (B10)	osteoblastos	99,51	3399,61	394,96
75 (C10)	osteoblastos	129,7	2781,63	441,44
76 (D10)	explante 1	114,51	>8500	263,23
77 (E10)	explante 1	<97,66	>8500	279,05
78 (F10)	explante 1	244,34	>8500	279,05
79 (G10)	explante 2	152,81	>8500	146,78
80 (H10)	explante 2	114,51	>8500	204,18
81 (A11)	explante 2	<97,66	>8500	130,85
82 (B11)	explante 3	248,41	>8500	246,99
83 (C11)	explante 3	244,34	>8500	255,16
84 (D11)	explante 3	232,17	>8500	276,05
85 (E11)	explante 4	122,08	>8500	<48.828
86 (F11)	explante 4	118,29	>8500	<48.828
87 (G11)	explante 4	92,09	>8500	ERROR
88 (H11)	cordón	<97,66	6908,1	1986,62
89 (A12)	cordón	<97,66	6490,7	1846,1
90 (B12)	cordón	<97,66	>8500	1886,73
91 (C12)	explante 5	432,93	>8500	166,88
92 (D12)	explante 5	331,04	>8500	190,57
93 (E12)	explante 5	339,43	>8500	204,18
94 (F12)	adiposo	<97,66	>8500	255,16
95 (G12)	adiposo	<97,66	>8500	251,09
96 (H12)	adiposo	<97,66	>8500	309,64

Figura 4. Datos correspondientes a los cultivos en concentraciones normales en distintos medios.

Se obtuvieron las medias de los tres datos obtenidos en los medios de cultivo a concentraciones normales, teniendo las siguientes consideraciones: cuando el valor se encontraba por debajo de la concentración de proteína registrable no se tomaba como valor para las medias, cuando los tres datos estaban por debajo de esa concentración se le asignaba el valor 0 y cuando el valor estaba por encima de la curva de calibración se tomaba el máximo valor registrable para cada proteína. En caso de la OPG, se realizó la misma sistemática con los datos del medio diluido. (Figuras 5 y 6)

	MEDIAS OC (pg/ml)	MEDIAS OPG (pg/ml)	MEDIAS OPN (pg/ml)
papila 1	122,29	5534,94	961,90
papila 2	157,74	8429,20	0,00
temp 1	162,30	8500,00	74,12
temp 2	0,00	8500,00	211,51
adulta	204,22	8500,00	891,69
explante 1	179,43	8500,00	273,78
explante 2	133,60	8500,00	160,60
explante 3	241,64	8500,00	259,40
explante 4	110,82	8500,00	0,00
explante 5	367,80	8500,00	187,21
mg63	154,02	8500,00	36,06
osteoblastos	114,61	3128,52	379,50
cordón	0,00	7299,60	1906,48
adiposo	0,00	8500,00	271,96

Figura 5. Datos correspondientes a las medias de los tres datos registrados en los medios de cultivo a concentración normal.

	MEDIAS OPG (pg/ml)
papila 1	4051,09
papila 2	4022,81
temp 1	8500,00
temp 2	8500,00
adulta	8302,19
explante 1	8500,00
explante 2	8158,78
explante 3	8221,41
explante 4	6253,52
explante 5	8500,00
mg63	8500,00
osteoblastos	1438,48
cordón	5312,18
adiposo	8500,00

Figura 6. Datos correspondientes a las medias de osteoprotegerina de los dos datos registrados en los medios de cultivo a concentración diluida.

Discusión

Osteocalcina

Se observan los niveles más altos de osteocalcina en las muestras de explantes óseos, encontrándose “explante 5” en el valor más alto de los medios de cultivo. Por el contrario, los niveles más bajos de osteocalcina se encontraron en las muestras procedentes de cordón umbilical, tejido adiposo y, curiosamente, en una de las muestras de pulpa de diente temporal.

Las células madre procedentes de tejidos en relación ósea observamos que tienen una mayor tendencia a producir osteocalcina. (Figura 7)

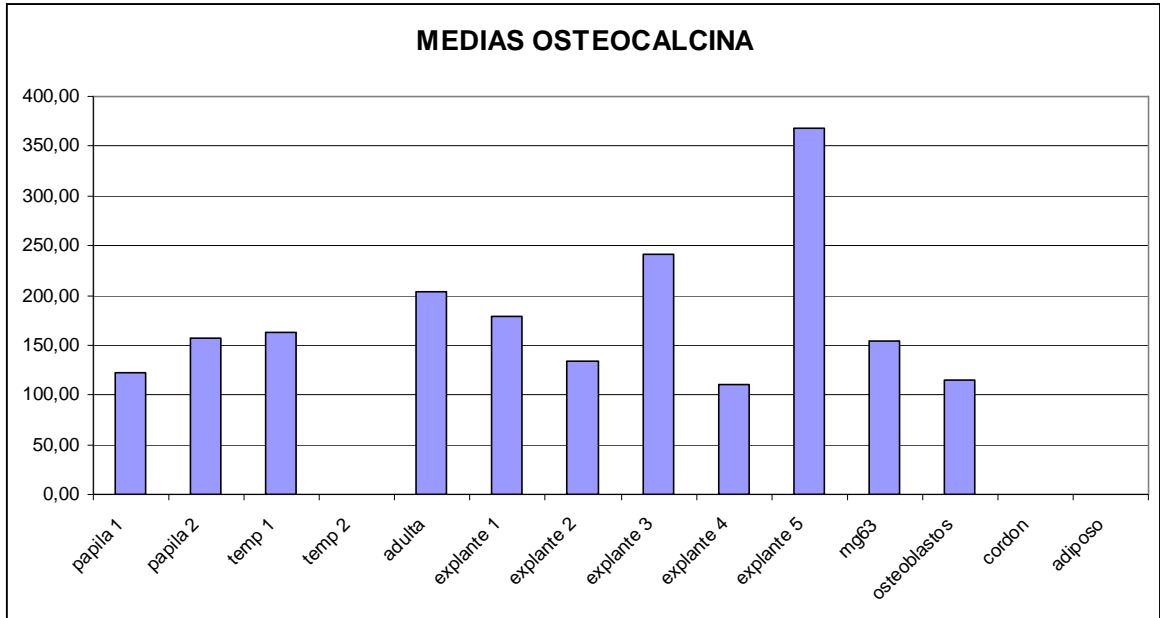


Figura 7. Medias de los valores de osteocalcina en los distintos medios de cultivo a concentraciones normales.

Osteoprotegerina

En la osteoprotegerina encontramos los valores, en general, por encima del máximo detectable en la curva de calibración, salvo en el caso de osteoblastos que aparece en concentraciones menores que el resto. También se encuentran ligeramente por debajo del resto uno de los cultivos procedentes de papila y de cordón umbilical. (Figura 8).

Analizados los datos del medio diluido se mantiene la tendencia a estar disminuidos los valores de osteoblastos, seguido de los medios de cultivo de células madre procedentes de papila y cordón umbilical. (Figura 9)

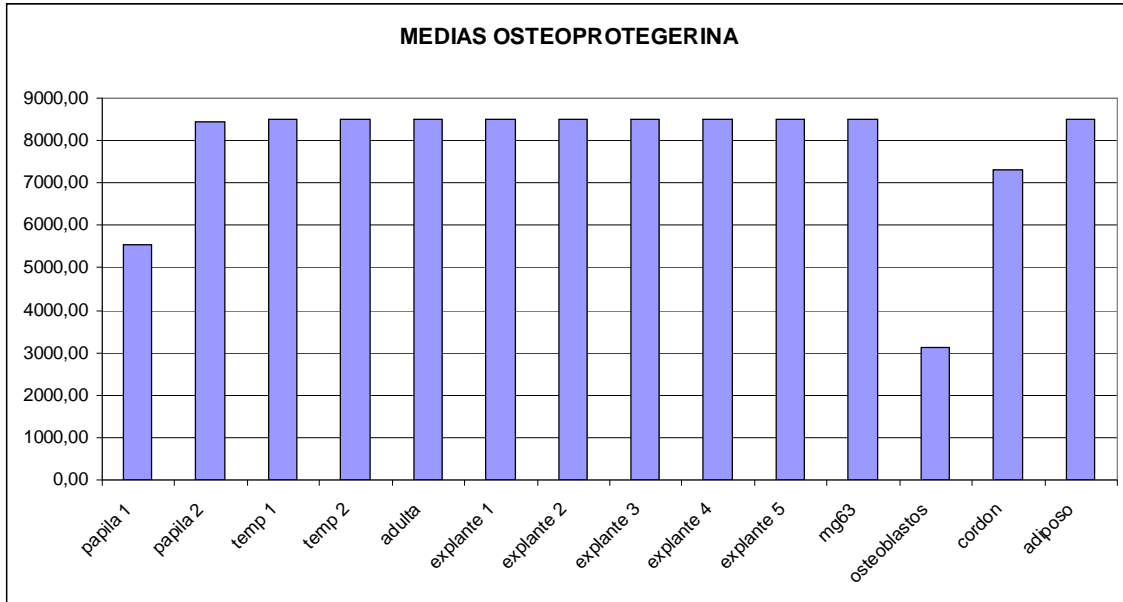


Figura 8. Medias de los valores de osteoprotegerina en los distintos medios de cultivo a concentraciones normales.

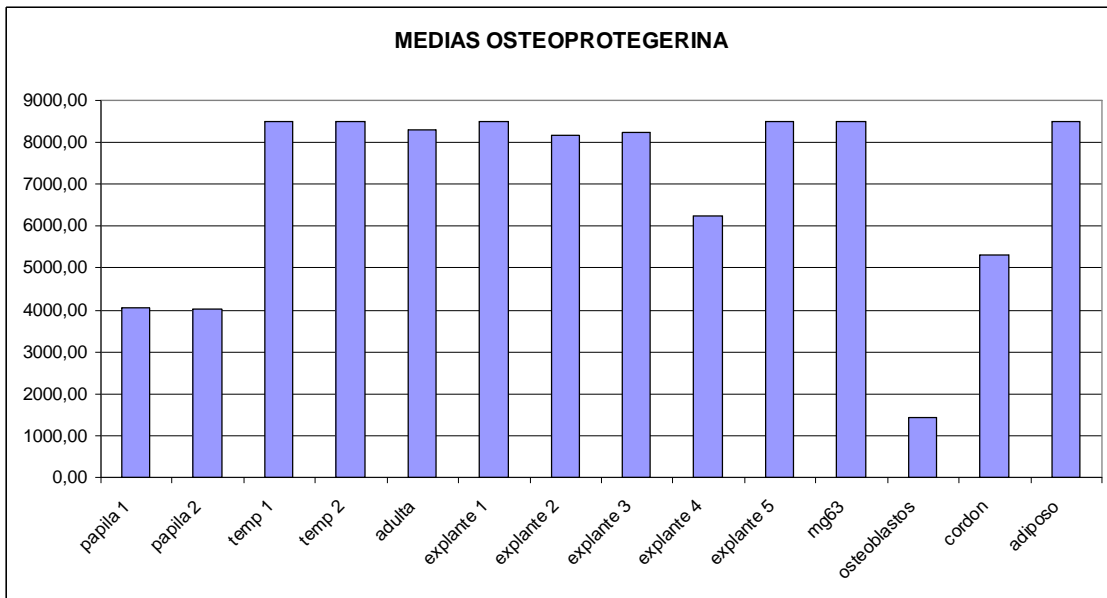


Figura 9. Medias de los valores de osteoprotegerina en los distintos medios de cultivo diluidos.

Osteopontina

Una de las líneas celulares procedentes de papila (“papila 1”), además de los cultivos celulares procedentes de pulpa dental adulta y de cordón umbilical se encuentran en los valores más elevados. Destaca que el medio de cultivo de células de cordón, que son las más indiferenciadas, tenga valores elevados de osteopontina con respecto al resto de medios de cultivo. En el resto de medios de cultivo se aprecian valores bajos de osteopontina, estando en algunos casos por debajo de la curva de calibración. (Figura 10)

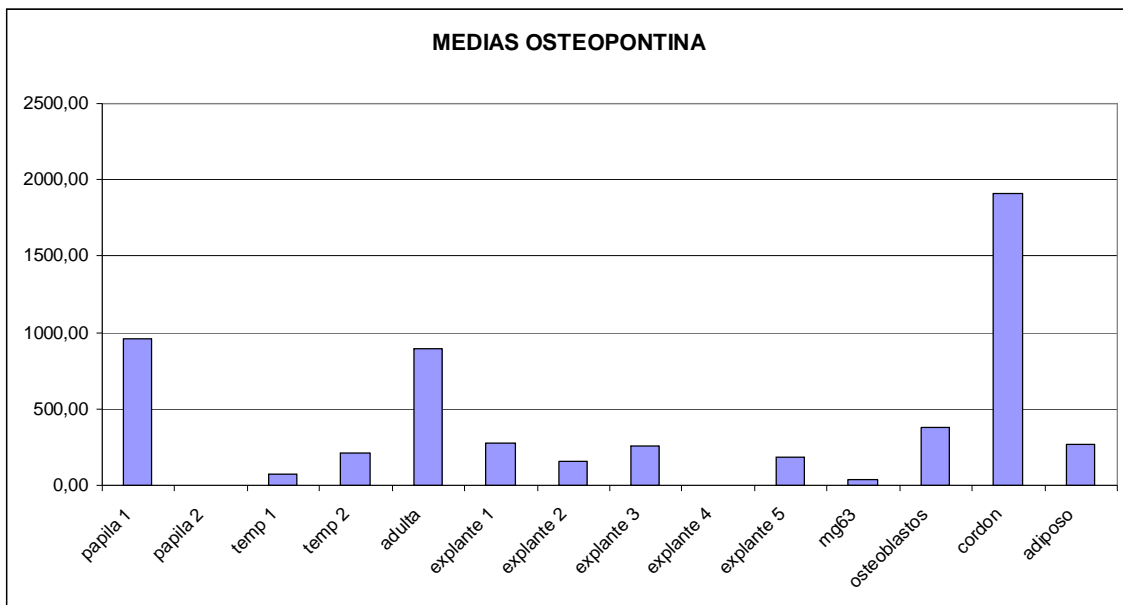


Figura 10. Medias de los valores de osteopontina en los distintos medios de cultivo a concentraciones normales

Es importante reseñar que no se encuentran valores parecidos de las tres proteínas para los medios de cultivo procedentes de células osteoblásticas y células MG-63, dato que destaca dado que son líneas celulares de comportamiento muy parecido.

Otro dato que quizá pueda ser relevante es el gran parecido que hay entre las células MG-63 y las procedentes de explantes óseos. (Figura 11)

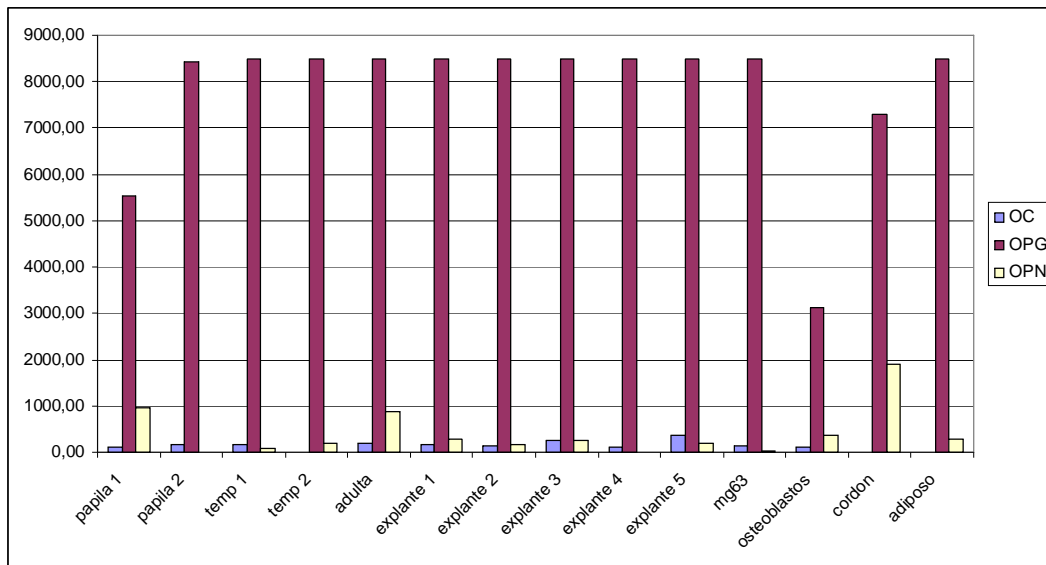


Figura 11. Medias de los datos de osteocalcina, osteoprotegerina y osteopontina de todos los medios de cultivo

Conclusión

Podemos decir las siguientes conclusiones con los datos obtenidos:

1. Hemos realizado la determinación de los niveles de osteocalcina, osteopontina y osteoprotegerina en el medio de cultivo de distintas líneas celulares.
2. Los niveles máximos de osteocalcina se encontraron en: células procedentes de explantes óseos.
3. Los niveles mínimos de osteocalcina se encontraron en: células de cordón umbilical, tejido adiposo y uno de los medios de cultivo de células de pulpa temporal.
4. Los niveles de osteoprotegerina se encontraron por encima de la curva de calibración, siendo indeterminable su concentración exacta en la mayoría de los casos, excepto en los medios de cultivo de osteoblastos, cordón umbilical y papila, que se encontraban en valores más bajos.
5. Los niveles más altos de osteopontina se encontraron en: células procedentes de cordón umbilical, pulpa dental adulta y uno de papila.

6. Los niveles mínimos de osteopontina se encontraron en: uno de los medios de cultivo de células procedentes de papila y otro de explante óseo, seguido de células MG-63.

7. Aunque es necesario realizar nuevas valoraciones parece encontrarse una tendencia en la que las líneas procedentes de tejidos óseos producen niveles más elevados de osteocalcina y menos niveles de osteopontina.

Bibliografía

-
- ¹ Magallanes Fabián M, Carmona Rodríguez B, Álvarez Pérez MA. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Revista Odontológica Mexicana*. 2010; 14 (1): 15-20.
- ² Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974; 2(2): 83–92.
- ³ Razzouk S, Schoor R. Mesenchymal stem cells and their challenges for bone regeneration and osseointegration. *Journal of periodontology*. 2011.
- ⁴ López-Laguna M, Saldaña-Díaz A, Rafael L, Rodríguez-Altónaga JA, Ramos J, García P et al. Marcaje de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo para su localización y seguimiento mediante RM en terapias de regeneración ósea. *Rev esp cir ortop traumatol*. 2011; 55 (5): 369—77.
- ⁵ Bahrambeigi V, Salehi R, Hashemibeni B, Esfandiari E. Transcriptomic comparison of osteopontin, osteocalcin and core binding factor 1 genes between human adipose derived differentiated osteoblasts and native osteoblasts. *Adv Biomed Res*. 2012; 1: 8.
- ⁶ Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R. Endocrine actions of osteocalcin. *International Journal of Endocrinology*. 2013.
- ⁷ Viegas C, Simes D, Williamson M, Cavaco S, Laizé V, Price P et al. Sturgeon Osteocalcin Shares Structural Features with Matrix Gla Protein: Evolutionary Relationship and Functional Implications. *The J Biol. Chem*. 2013.
- ⁸ Jorquera R, Gonzalez J, Gutierrez S, Jorquera O, Rivera S. Osteocalcina en el fluido crevicular de pacientes con periodontitis crónica progresiva. *Periodontia*. 2009; 19 (4): 89-93.
- ⁹ İncesoy-Özdemir S, Şahin G, Bozkurt C, Ceyda A, Balkaya E, Ertem U. The relationship between cerebrospinal fluid osteopontin level and central nervous system involvement in childhood acute leukemia. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 2013; 55: 42- 9.
- ¹⁰ Rao G, Du L, Chen Q. Osteopontin, a possible modulator of cancer stem cells and their malignant niche. *Oncolmmunology*. 2013; 2.
- ¹¹ Li X, Qi Y, Ma X, Huang F, Guo H, Jiang X et al. Chemokine (C-C Motif) Ligand 20, a Potential Biomarker for Graves' Disease, Is Regulated by Osteopontin. *PLoS ONE*. 2013; 8(5).

-
- ¹² Pateinakis, Papagianni A, Douma S, Efstriatiadis G, Memmos D. Associations of fetuin-A and osteoprotegerin with arterial stiffness and early atherosclerosis in chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrology*. 2013; 14: 122.
- ¹³ Guo C, Hu F, Zhang S, Wang Y, Liu H. Association between osteoprotegerin gene polymorphisms and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients. *Genetics and Molecular Biology*. 2013; 36 (2): 177-82.
- ¹⁴ Zhou S, Fang X, Xin H, Li W, Qiu H, Guan S. Osteoprotegerin Inhibits Calcification of Vascular Smooth Muscle Cell via Down Regulation of the Notch1-RBP-J κ /Msx2 Signaling Pathway. *PLoS ONE*. 2013; 8(7).
- ¹⁵ Weiss RM, Lund DD, Chu Y, Brooks RM, Zimmerman KA, El Accaoui R et al. Osteoprotegerin Inhibits Aortic Valve Calcification and Preserves Valve Function in Hypercholesterolemic Mice. *PLoS ONE*. 2013; 8(6).
- ¹⁶ Jandal K, Krzanowski M, Chowanec E, Kuśnierz-Cabala B, Dumnicka P, Kraśniak A et al. Osteoprotegerin as a marker of cardiovascular risk in patients on peritoneal dialysis. *Pol Arch Med Wewn*. 2013; 123 (4): 149-55.
- ¹⁷ Palumbo S, Li W-J. Osteoprotegerin Enhances Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue engineering*. 2013; 0 (0): 1-12.
- ¹⁸ Queiroz AC, Nóbrega PB, Oliveira FS, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Palioto DB et al. Treatment of intrabony defects with anorganic bone matrix/p-15 or guided tissue regeneration in patients with aggressive periodontitis. *Braz Dent J*. 2013; 24(3): 204-12.
- ¹⁹ Rolim Filho EL, Larrazabal MC, Costa Júnior LF, Santos SM, Santos RM, Aguiar JL. Effect of autologous stem cells on regenerated bone during distraction osteogenesis by Ilizarov technique in the radius of dogs: histomorphometric analysis. *Acta Cir Bras*. 2013; 28(8):574-81.
- ²⁰ Woo M, Seong D, Hee K, Ryung H, Keun I, Hyang J et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions. *Blood Res*. 2013; 48(2): 107–14.
- ²¹ Giuliani N, Lisignoli G, Magnani M, Racano C, Bolzoni M, Palma BD et al. New Insights into Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications for Bone Regeneration in Pediatric Orthopaedics. *Stem Cells Int*. 2013.
- ²² Arévalo JA, Páez DM, Rodríguez VM. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS*. 2007; 5 (8): 177-84.
- ²³ Zheng YH, Xiong W, Su K, Kuang SJ, Zhang ZG. Multilineage differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Exp Ther Med*. 2013; 5(6): 1576–80.

²⁴ Jones GN, Moschidou D, Lay K, Abdulrazzak H, Vanleene M, Shefelbine SJ et al. Upregulating CXCR4 in human fetal mesenchymal stem cells enhances engraftment and bone mechanics in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1(1): 70-8.
