

Diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo mediante un mecanismo de nanovibración

Máster en Investigación Biomédica

Trabajo Fin de Master

Autora:

Amaia Martínez Blázquez

Directoras:

Ana Isabel Alonso Varona

Begoña Castro Feo

Diana Martínez Redondo

Abstract

Bone damage caused by trauma, infection, tumors or even aging, make bone one of the most transplanted tissues globally. To date, from a clinical point of view, the most effective method for bone transplantation is the use of autologous grafts due to their osteoinductive, osteoconductive and osteogenic properties. However, donor site morbidity and limited bone supply make it necessary to study new ways to obtain bone tissue. At this point, bone tissue engineering is of special interest, as the combination of stem cells with osteoinductive biomaterials resembles the performance of autologous grafts.

Bone development is controlled by a wide variety of factors *in vivo*. Among them, mechanical stimuli stand out, key in the induction of osteogenesis in adipose derived stem cells (ASC). In this work we have sought to induce the osteogenic differentiation process in ASC through a nanovibration mechanism generated by a bioreactor. The final aim is to implement a simple, reproducible and scalable protocol under GMP (Good Manufacturing Practices) quality standards to develop a Cell Therapy Product without any chemical induction. The results obtained through the analysis of early markers such as, alkaline phosphatase activity and gene expression of osteonectin (SPARC) and bone sialoprotein (IBSP), demonstrate pre-differentiation of nanovibrated ASCs to osteogenic lineages, compared to controls. These preliminary results could be the basis for promising advances in bone cell-therapy.

Laburpena

Traumatismoek, infekzioek, tumoreek edo zahartzeak eragindako hezur-kaltearen ondorioz, hezurra da munduan gehien transplantatu izan den ehunetariko bat. Orain arte, ehun autologoa izan da hezur-transplantea egiteko modurik eraginkorrena, ikuspuntu klinikoa kontutan hartuta. Hala ere, erauzketa-gunean gerta litezkeen zailtasunen eta beren hornidura mugatuaren ondorioz, hezur ehun alogenikoa lortzeko bide berriak aztertzea beharrezkoa da. Ehunen ingenieritzak gero eta abantail handiagoak eskaintzen ditu hezurren birsorkuntzaren behar honetan. Jatorri alogenikoa duten zelula ama eta gaitasun osteoinduktorekun biomaterialak konbinatzen duten tratamenduak, injertu autologoaren errendimendua berdintzea lortzen ari dira.

Hezuraren garapena hainbat *in vivo* faktorearen kontrolean oinarritzen da. Horien artean, azpimarragarriak dira zelula ama mesenkimaletan (ASC) estimulu mekanikoek eragindako osteogenesi prozesuak. Lan honetan, bioerreaktore batek sortutako nanobibrazio-mekanismo baten bidez, ASCen desberdintze osteogenikoaren prozesua bultzatu nahi izan da; indukzio kimikorik gabe. Erraza, errepikagarria eta fabrikazio praktika onen kalitate-estandarrean eskalagarria den protokoloa ezartzeko helburuarekin. Markatzaile goiztiarren analisiaren bidez lortutako emaitzek, hala nola

fosfatasa alkalinoaren aktibitateak eta osteonektinaren (SPARC) eta hezur-sialoproteinaren (IBSP) adierazpen genikoak erakusten dute ASC nanobibratuen pre-desberdinketa osteogenikoa, kontrolekin alderatuz. Atariko emaitza horiek oinarria izan litezke hezurrari aplikatutako zelula-terapiaren munduan aurrerapen oparoak lortzeko.

Resumen

El daño óseo causado por traumatismos, infecciones, tumores o incluso por envejecimiento, hacen que el hueso sea uno de los tejidos más trasplantado globalmente. Hasta la fecha el método más eficaz, desde un punto de vista clínico, para el trasplante óseo es el tejido autólogo gracias a sus propiedades osteoinductoras, osteoconductoras y osteogénicas. Sin embargo, complicaciones en el sitio de extracción y su suministro limitado, hacen que se necesiten estudiar nuevas vías para la obtención de tejido óseo. En este punto, cobra especial interés la ingeniería tisular aplicada a hueso, gracias a la combinación de células madre con biomateriales con capacidad osteoinductora podrían igualar el rendimiento de los injertos autólogos.

El desarrollo óseo está sujeto al control de una amplia variedad de factores *in vivo*. Entre ellos destacan los estímulos mecánicos, claves en la inducción de la osteogénesis en células madre mesenquimales derivadas de tejidos adiposo (ASC). En este trabajo se ha buscado inducir el proceso de diferenciación osteogénica en ASCs mediante un mecanismo de nanovibración generado por un biorreactor. Con el objetivo de implantar un protocolo sencillo, reproducible y escalable bajo los estándares de calidad NCF (Normas de Correcta Fabricación) para la producción de tejido óseo sin necesidad de inducción química. Los resultados obtenidos mediante el análisis de marcadores tempranos como, la actividad fosfatasa alcalina y la expresión génica de osteonectina (SPARC) y sialoproteína ósea (IBSP) reflejan una pre-diferenciación de las ASCs nanovibradas a linajes osteogénicos, respecto a los controles. Estos resultados preliminares podrían ser la base para obtener avances prometedores en el mundo de la terapia celular aplicada a hueso.

INDICE

1. Introducción	7
1.1 Injertos óseos	7
1.2 Células madre e ingeniería tisular	7
1.2.1 <i>Células madre mesenquimales de origen adiposo (ASCs)</i>	8
1.3 Diferenciación osteogénica de las ASCs	8
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1 Células	10
3.2 Caracterización inmunofenotípica de los cultivos	10
3.3 Estudio de la proliferación y el ciclo celular	11
3.4 Determinación del potencial de diferenciación de las ASCs a las tres líneas mesodérmicas	11
3.4.1 <i>Diferenciación adipogénica de las ASCs</i>	12
3.4.2 <i>Diferenciación condrogénica de las ASCs</i>	12
3.4.3 <i>Diferenciación osteogénica de las ASCs</i>	12
3.5 Biorreactor de nanovibración	13
3.5.1 <i>Establecimiento de las condiciones de cultivo en el biorreactor</i>	13
3.5.2 <i>Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en el cultivo nanoV</i>	13
3.5.3 <i>Determinación de los marcadores osteonectina y sialoproteína ósea mediante qRT-PCR en el cultivo nanoV</i>	14
3.6 Análisis estadístico	14
4. Resultados	15
4.1 Caracterización inmunofenotípica	15
4.2 Determinación del ciclo celular y proliferación de los cultivos	16
4.3 Determinación del carácter multipotencial de las ASCs	18
4.4 Evolución de la cinética de proliferación de los cultivos control nanoV y nanoV	18
4.5 Efecto de la nanovibración sobre la diferenciación osteogénica de los cultivos	19
4.5.1 <i>Actividad fosfatasa alcalina</i>	19
4.5.2 <i>Expresión génica de SPARC (osteonectina) e IBSP (sialoproteína ósea)</i>	20

5. Discusión y conclusiones	21
6. Bibliografía	23

1. Introducción

1.1 Injertos óseos

El hueso es el segundo tejido más trasplantado globalmente, con más de medio millón de intervenciones anuales tanto en Europa como en Estados Unidos (Haugen *et al.*, 2019). Los daños óseos pueden ser causados por traumatismos, infecciones, tumores, defectos congénitos o incluso por envejecimiento. Hasta la fecha, el uso de injertos autólogos se ha considerado el método más eficaz desde un punto de vista clínico para la regeneración de defectos óseos (García-Gareta *et al.*, 2015), puesto que ofrece propiedades osteoinductoras, osteoconductoras e inducen la osteogénesis. Además, evita la respuesta inmune contra el injerto, ya que el donante es el propio paciente (Sohn & Oh, 2019). Sin embargo, el suministro óseo para este tipo de injertos es muy limitado, además de existir posibles complicaciones en el sitio de extracción. Estas desventajas se pueden contrarrestar utilizando injertos alogénicos, cuyas propiedades osteoinductoras y osteoconductoras les proporcionan una ventaja significativa. Sin embargo, el hecho de que carezcan de propiedades osteogénicas, debido a la ausencia de células viables, así como que puedan llegar a ser un canal de transmisión de enfermedades e infecciones, e incluso puedan generar una posible respuesta inmune contra el injerto (Janicki & Schmidmaier, 2011; Myeroff & Archdeacon, 2011), hacen que esta alternativa terapéutica deba ser cuidadosamente valorada.

En este contexto, la ingeniería tisular y, por tanto, la medicina regenerativa, adquieren especial interés. Este campo multidisciplinar se basa en la reparación, sustitución o regeneración de células, tejidos u órganos. Todo ello, con el objetivo de restaurar cualquier daño estructural y/o funcional (Daar & Greenwood, 2007). Las limitaciones de los métodos empleados hasta la fecha para la regeneración ósea pueden ser superadas gracias a la ingeniería tisular. La combinación de células con capacidad de diferenciación a linajes osteogénicos y biomateriales específicos con propiedades osteoinductoras, pueden llegar a igualar el rendimiento de los autoinjertos y, por tanto, hacer frente a las limitaciones que presentan tanto los injertos autólogos como alogénicos (Amini *et al.*, 2012).

1.2 Células madre e ingeniería tisular

Las células madre adultas participan e inducen todos los mecanismos biológicos que están involucrados en el proceso de regeneración y funcionalidad de los tejidos durante toda la vida (Mazini *et al.*, 2019). Es por eso que, una de las piezas claves que hacen que la ingeniería tisular sea un método prometedor en la regeneración de defectos óseos, es el uso de células madre. Gracias a su capacidad de autorrenovación junto con su potencial

para diferenciarse en otros tipos celulares, hacen que la terapia con células madre aplicada a la ingeniería tisular pueda llegar a ser una vía importante para mejorar los resultados de las lesiones de tejidos con escasa capacidad de autorreparación (Grottkau & Lin, 2013; Thuraiajah *et al.*, 2017).

Las células madre multipotentes, son aquellas que derivan de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). A diferencia de las células madre pluripotentes, su capacidad de diferenciación está limitada a la capa embrionaria de la que provengan. Sin embargo, hay células madre multipotentes, como es el caso de las células madre mesenquimales, que aun proviniendo de la capa mesodérmica tienen el potencial para diferenciarse en diferentes tipos celulares de origen ectodérmico y endodérmico (Ullah *et al.*, 2015).

1.2.1 Células madre mesenquimales de origen adiposo (ASCs)

El tejido adiposo es una de las principales fuentes de células madre mesenquimales, gracias a su fácil obtención mediante prácticas poco invasivas y abundancia, en comparación con otras fuentes (Riazi *et al.*, 2009). Las ASCs poseen potencial adipogénico, condrogénico y osteogénico, entre otros. Esa capacidad de diversificación junto con características como su fácil aislamiento o su alta cinética proliferativa (Ma *et al.*, 2017), hacen que adquieran especial interés en procesos regenerativos (Mazini *et al.*, 2019).

Numerosos estudios preclínicos han demostrado que las ASCs mejoran la curación ósea a través de su diferenciación en osteoblastos y a los efectos paracrinos que faciliten la migración y diferenciación de células precursoras residentes (Barba *et al.*, 2017). Por esta razón, su uso podría jugar un papel primordial en la medicina regenerativa actual y, en concreto, en la ingeniería tisular aplicada a hueso.

1.3 Diferenciación osteogénica de las ASCs

Existen múltiples investigaciones que validan el potencial osteogénico de las ASCs. El método convencional para llevar a cabo este proceso, es una estimulación química (Grottkau & Lin, 2013). Sin embargo, el desarrollo óseo está sujeto al control de una amplia variedad de factores *in vivo*. Entre estos factores, destacan los estímulos mecánicos, eléctricos y magnéticos, además de los estímulos bioquímicos (Shafaei *et al.*, 2020).

Los estímulos mecánicos son factores fundamentales para la diferenciación osteogénica de las ASCs. Así, se ha demostrado que las fuerzas mecánicas aplicadas a las células generan diversos tipos de respuestas celulares mediante un mecanismo denominado mecanotransducción (Salazar *et al.*, 2013). La mecanotransducción en células madre es

un proceso muy complejo que involucra múltiples vías de señalización que aún no se comprenden completamente (Morcos *et al.*, 2015). De hecho, estudios como el dirigido por Campsie *et al.* (2019) ponen de manifiesto la activación de las vías de señalización involucradas en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales *in vitro*, a través de mecanismos de mecanotransducción. Todo ello, gracias a la nanovibración generada por un biorreactor sin necesidad de inducción química.

El potencial de este nuevo método de diferenciación osteogénica, plantea la posibilidad de implantar un protocolo sencillo, reproducible y escalable para obtener resultados clínicos óptimos desde un punto de vista de fabricación industrial, siempre bajo estándares de calidad NCF (Normas de Correcta Fabricación). En definitiva, la modulación del microambiente físico podría llegar a reemplazar el uso de factores solubles para la inducción de la diferenciación osteogénica en las ASCs (Salazar *et al.*, 2013).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es desarrollar el escalado a nivel industrial del proceso de diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, mediante el estímulo inducido por fuerzas de nanovibración en un biorreactor. El desarrollo del escalado permitirá obtener un producto de terapia celular en condiciones NCF.

Para la consecución de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos concretos:

- i) Establecer las condiciones de cultivo a escala industrial para la diferenciación osteogénica mediante un biorreactor de nanovibración
- ii) Evaluar el nivel de diferenciación de las células cultivadas en el biorreactor de nanovibración en las condiciones de cultivo establecidas, para implantar un ensayo de caracterización adecuado que determine la calidad del producto final.

3. Materiales y métodos

3.1 Células

Las células empleadas en este proyecto fueron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs), cedidas por Histocell S.L. (Parque Tecnológico de Bizkaia, España). Las condiciones de cultivo de las ASCs fueron las siguientes: i) Cultivo con DMEM GlutaMAX™ (Dulbecco's Modified Eagle's medium high-glucose, Gibco, Praisley, UK) suplementado con gentamicina (10mg/ml, Gibco, Thermo Fisher, UK), Antibiotic-Antimycotic (100X) (10.000 U/ml penicilina, 10.000 µg/ml estreptomina y 25 µg/ml de antimicótico Fungizone™, Gibco, Thermo Fisher, Grand Island, NY, USA) y 10% de suero fetal bovino (FBS, Biochrom, Berlin, Germany). Este medio completo se utilizó para el cultivo en condiciones estándar de las ASCs, el cultivo de ASCs control del proceso de nanovibración cultivadas en paralelo sin nanovibración durante cuatro semanas (control nanoV) y para el cultivo de las ASCs nanovibradas durante cuatro semanas en el biorreactor de nanovibración (nanoV). ii) Cultivo con medios de diferenciación osteogénicos, StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), como control positivo del proceso de diferenciación osteogénica. En todos los casos los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% de CO₂ y condiciones de humedad a saturación.

3.2 Caracterización inmunofenotípica de los cultivos

Para estudiar la identidad de las propias ASCs, se llevó a cabo una caracterización inmunofenotípica de los cultivos mediante citometría de flujo. Se buscó identificar una selección de antígenos superficiales (**Tabla 1**) usando anticuerpos monoclonales conjugados con un fluorocromo determinado: CD45-FITC, CD166-AF⁶⁴⁷, CD44-PE y CD19-FITC (BD Pharmingen, BD Biosciences, San Jose, California); CD34-FITC, CD14-FITC y HLA-DR-FITC (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama); CD105-PE, CD13-PE, CD90-APC y CD73-APC (eBioscience, San Diego, California); y sus correspondientes isotipos control IgG1-FITC (SouthernBiotech), IgG1-PE (eBioscience), IgG1-APC (Life Technologies) e IgG1- AF⁶⁴⁷ y IgG2a-FITC (BD Pharmingen). La obtención y análisis de los datos se llevó a cabo en un citómetro de flujo GUAVA easyCyte (Merck, Millipore) empleando el software guavaSoft 3.2, y con al menos 10.000 eventos por muestra.

Tabla 1. Tabla resumen de los antígenos superficiales para la identificación de ASCs (Dominici *et al.*, 2006).

Antígenos superficiales	
Positivo ($\geq 95\%$)	Negativo ($\leq 5\%$)
CD 105	CD 45
CD 73	CD 34
CD 90	CD 14
CD 166	CD 19
CD 44	HLA-DR
CD 13	

3.3 Estudio de la proliferación y el ciclo celular

El análisis de la proliferación se realizó mediante el recuento celular cada 24 horas de los cultivos durante un período de cinco días (96 horas) utilizando el método de exclusión con Azul Tripan. Así mismo, se llevó a cabo un análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo para estimar la distribución de la población celular en las diferentes fases del ciclo (G0/G1, G2/M y S) en los mismos intervalos de tiempo. Para ello, las células se mantuvieron en una solución fijadora de etanol a 4°C hasta su análisis, se trataron con RNAasa A (100 $\mu\text{g/ml}$), y posteriormente se marcaron con yoduro de propidio (50 $\mu\text{g/ml}$) a temperatura ambiente durante 10 minutos y en oscuridad (λ_{ex} : 488; λ_{em} : 617 nm). De esta forma se garantiza que el marcaje detectado se debe exclusivamente al DNA presente en las células. Se adquirieron al menos 10.000 eventos en cada muestra analizada. De los eventos adquiridos se eliminaron las partículas más pequeñas consideradas *debris* celular en el gráfico de SSC vs FSC (escala lineal). A continuación, se seleccionaron las células individuales eliminando los dobletes o tripletes obtenidos durante la adquisición (gráfico área vs tamaño). Finalmente, en el histograma de intensidad de fluorescencia lineal del canal rojo (695/50 nm) correspondiente al yoduro de propidio, se determinó el porcentaje de células que se encuentra en cada estado del ciclo celular (**Figura 2b**).

3.4 Determinación del potencial de diferenciación de las ASCs a las tres líneas mesodérmicas

Con el objetivo de analizar la capacidad de multipotencia de las ASCs empleadas, se llevó a cabo la diferenciación a las tres líneas mesodérmicas *in vitro* de la línea celular empleada en este estudio. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se mantuvieron durante 14-21 días, con DMEM-GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con 10% de FBS y antibióticos, en el caso del control, o medios específicos para la inducción de la diferenciación adipogénica (StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco,

Life Technologies, Grand Island, NY, USA), condrogénica (StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) y osteogénica (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Se realizaron triplicados de cada condición y se hicieron cambios de medio cada 48-72 horas. Las placas se mantuvieron a 37°C, 5% de CO₂ y condiciones de humedad a saturación.

3.4.1 Diferenciación adipogénica de las ASCs

Para la diferenciación adipogénica, las células se sembraron a 10.000 células/cm², y los acúmulos lipídicos intracelulares se detectaron tras 14 días mediante AdipoRed™ Assay Reagent (Lonza, Walkersville, Maryland), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51, Hamburg, Germany).

3.4.2 Diferenciación condrogénica de las ASCs

En el caso de la diferenciación condrogénica, las células se sembraron a 15.000 células/cm². El colágeno de tipo II, característico de la matriz extracelular generada por los condroblastos (Dominici *et al.*, 2006), se detectó tras 21 días mediante la tinción con Alcian Blue (Sigma-Aldrich, Spuce Street St. Louis). Las muestras se fijaron con formaldehído al 4% a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron con un tampón fosfato salino 1X (PBS, Biochrom, Berlin, Germany) y posteriormente con agua destilada y HCl 0,1N (pH 1). Las células se incubaron con la tinción de Alcian Blue al 1% en HCl 0,1N (pH 1) a temperatura ambiente y oscuridad. Por último, las muestras se lavaron con HCl 0,1N para eliminar el exceso de colorante, y se mantuvieron en agua destilada. Las imágenes se tomaron con un microscopio de luz (Olympus IX51, Hamburg, Germany).

3.4.3 Diferenciación osteogénica de las ASCs

Para la diferenciación osteogénica, las células se sembraron a 2.000 células/cm² y los depósitos de calcio extracelular se detectaron tras 21 días mediante la tinción con Alizarin red S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Las muestras se fijaron con formaldehído al 10% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS 1X y agua destilada y se incubaron con el colorante, Alizarin Red S, al 2% en agua destilada en oscuridad y con agitación. Tras la tinción, las muestras se lavaron con agua destilada. Las imágenes se tomaron con un microscopio de luz (Olympus IX51, Hamburg, Germany).

3.5 Biorreactor de nanovibración

Los biorreactores de nanovibración, prototipo fabricado por la Universidad de Glasgow, se calibraron según el protocolo “Nanokick Bioreactor Set Up Instructions and Calibration with VSEW Wireless Accelerometer” (Campsie *et al.*, 2019). Se tomaron medidas de los cuatro cuadrantes de cada biorreactor con un acelerómetro comercial (Wireless Vibration Meter Data Logger, VSEM mk2-8g), donde se buscó obtener un desplazamiento (nanovibración) de 10-90 nm a una frecuencia de 1kHz. Todo ello se monitorizó mediante el software facilitado por la misma casa comercial.

3.5.1 Establecimiento de las condiciones de cultivo en el biorreactor

El proceso de pre-diferenciación de las ASCs a osteoblastos en un biorreactor de nanovibración se llevó a cabo con cultivos celulares en pase 3 (P3). Para ello se descongelaron $5-10 \times 10^6$ células en P1. Los viales se descongelaron por completo en el baño de agua a 37°C durante 2-5 minutos, una vez descongelados se realizó un lavado con DMEM GlutaMAX™. Las muestras se centrifugaron a 500g durante 5 minutos para eliminar el exceso de dimetil sulfóxido (DMSO, Fisher Scientific, Greel Belgium). A continuación, se llevó a cabo el conteo celular y la determinación de la viabilidad celular mediante el método de exclusión con Azul Tripán (HyClone™, Healhcare Bio-Science, Austria) usando un hemocitómetro. Las células se sembraron a una concentración de 1.500-2.500 células/cm² en un frasco de cultivo celular de 3.180 cm² (Corning, Tewksbuty, MA, USA) en DMEM GlutaMAX™ suplementado para la amplificación del cultivo. Se realizaron cambios de medio cada 72-96 horas y una vez alcanzado el 80% de la confluencia, las células se levantaron empleando tripsina 0,05%-EDTA (Gibco, Thermo Fisher, Fountain Drive, Paistey, UK) y se resembraron a una concentración 1,500-2,500 células/cm² en dos frascos de 3,180 cm², uno como control del proceso (control nanoV) y el otro se colocó sobre el biorreactor de nanovibración (cultivo nanoV) gracias a la adhesión de un imán en el propio frasco. Se realizaron cambios de medio cada 72-96 horas en ambos cultivos durante cuatro semanas. Los cultivos en todo momento se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂. Una vez transcurridas las cuatro semanas de cultivo, tanto el cultivo control nanoV como el cultivo nanoV se tripsinizaron y las células se criopreservaron a una concentración final de 10×10^6 células/ml en una solución tamponada con DMSO.

3.5.2 Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en el cultivo nanoV

La cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina se llevó a cabo mediante el Kit comercial StemTAG™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Cell Biolabs Inc, San Diego, USA). Se analizaron unas 2×10^5 células para cada una de las condiciones de estudio. La absorbancia de las muestras se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo

Electron Multiskan Ascent Microplate Reader, Diamond Hill Road, Woonsocket) a 405 nm. Los resultados obtenidos fueron normalizados frente a la cantidad de DNA presente en cada muestra gracias al Kit CyQUANT™ Direct Cell Proliferation Assay (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), la lectura de la fluorescencia se llevó a cabo en un fluorímetro (λ_{ex} : 485; λ_{em} : 538 nm) (Fluoroskan Ascent® FL, Thermo Fisher Scientific, Finland).

3.5.3 Determinación de los marcadores osteonectina y sialoproteína ósea mediante qRT-PCR en el cultivo nanoV

Se analizaron unas 2×10^6 de células, de todas las condiciones de estudio. El RNA de las muestras se extrajo mediante el Kit NucleoSpin® RNA XS (Macherey-nagel, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA fue calculada gracias al espectrofotómetro Synergy HT (Winooski, Vermont, USA) que realizó lecturas a 260/280 nm.

Para la obtención del cDNA mediante retrotranscripción se empleó el Kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Por último, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se realizó gracias a iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), en un sistema de detección CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). El programa de amplificación se basó en una primera etapa de 10 minutos a 95°C, seguido de 39 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, finalizando con una etapa de *melting*. Se empleó GADPH como gen constitutivo (*housekeeping*), y los genes de estudio fueron osteonectina (SPARC) y sialoproteína ósea (IBSP). Las secuencias *forward* y *reverse* de los cebadores fueron: 5'-CTTTTGCGTCGCCAG-3' y 5'-TTGATGGCAACAATATCCAC-3' para GADPH; 5'-AGAATGAGAAGCGCCTGGAG-3' y 5'-CTGCCAGTGTACAGGGAAGA-3' para SPARC y 5'-CAATCTGTGCCACTCACTGC-3' y 5'-CGGATGAGTCACTACTGCC-3' para IBSP. La expresión de los genes diana fue normalizada frente al gen constitutivo y el cultivo control nanoV usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.6 Análisis estadístico

El número de muestras analizadas se muestran descritas en cada experimento y los datos se expresaron como la media \pm SD. Los datos experimentales se analizaron estadísticamente utilizando Microsoft Excel. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante un estudio paramétrico t-Student con una distribución de dos colas y heteroestadística o pareada según el caso. Los intervalos de confianza se fijaron en 95% ($p < 0,05$), 99% ($p < 0,01$) y 99,9% ($p < 0,001$).

4. Resultados

4.1 Caracterización inmunofenotípica

Las células madre mesenquimales de origen adiposo empleadas en este trabajo se caracterizaron de acuerdo con los criterios mínimos de la Sociedad Internacional de Terapia Celular para células madre y estromales derivadas de tejido adiposo (Dominici *et al.*, 2006; Bourin *et al.*, 2013). Una de las características intrínsecas de las ASCs, es su patrón de antígenos superficiales. Para analizar si ese patrón se ha visto modificado mediante este nuevo método de cultivo, se realizó un inmunofenotipado de los cultivos. En la **Figura 1**, se muestra el esquema general del método empleado para analizar cada una de las muestras.

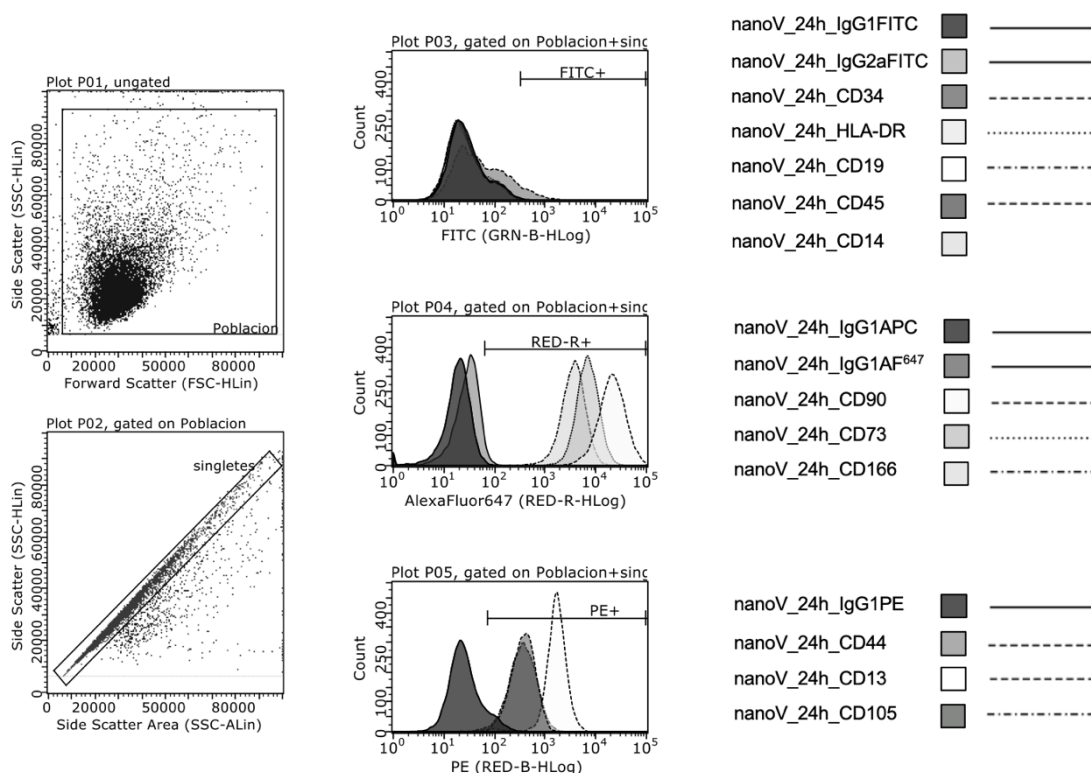


Figura 1. Panel representativo del inmunofenotipado de los cultivos de estudio. Se muestra el cultivo nanoV a las 24 horas post-descongelación. Plot P01) Gráfica tamaño (FSC) vs. rugosidad (SSC), se seleccionó toda la población excepto lo considerado *debris* celular; Plot P02) Selección de singletes; Plot P03) Histograma representativo de la intensidad de FITC, correspondiente a todos los marcadores negativos para las ASCs (CD 34, HLA-DR, CD19, CD45 y CD14); Plot P04) Histograma representativo de la intensidad de AlexaFluor⁶⁴⁷ y APC, correspondiente a los marcadores positivos para las ASCs (CD 166, CD90 y CD73); Plot P05) Histograma representativo de la intensidad de PE, correspondiente a los marcadores positivos para las ASCs (CD 44, CD13 y CD105). Al menos 10.000 eventos analizados.

Se analizaron los cultivos 24 horas post-descongelación, para evitar posibles interferencias generadas por el propio estrés de la descongelación. En la **Tabla 2** se pueden observar los porcentajes de cada uno de los antígenos superficiales para cada uno de los cultivos analizados; ASC, control nanoV y nanoV. En ninguno de los casos se observó una alteración del patrón fenotípico típico de las células mesenquimales (Dominici *et al.*, 2006; Bourin *et al.*, 2013). Las tres poblaciones revelaron expresión positiva (> 95%) de CD44, CD13, CD90, CD73, CD166 y CD105 y expresión negativa (<5%) de CD34, CD19, CD45, CD14 y HLA - DR

Tabla 2. Porcentajes de la presencia/ausencia de los antígenos de membrana estudiados mediante citometría de flujo (**Figura 1**) en cultivos de ASC, control nanoV y nanoV a las 24 horas post-descongelación. Se consideran positivos aquellos porcentajes superiores al 95% y negativos los porcentajes inferiores al 5%.

CD	% ASC	% control nanoV	% nanoV
CD44	98,05	99,30	99,51
CD13	99,85	99,81	99,10
CD90	99,92	99,89	99,84
CD73	99,84	99,83	99,90
CD34	1,10	5,40	3,35
HLA-DR	0,13	0,26	0,48
CD19	0,13	0,43	0,66
CD166	99,88	99,75	99,95
CD105	99,72	97,92	98,04
CD45	0,24	0,23	0,38
CD14	0,24	0,45	0,57

4.2 Determinación del ciclo celular y proliferación de los cultivos

Con el fin de analizar el posible efecto del biorreactor de nanovibración y las cuatro semanas de cultivo sobre la tasa proliferativa y el ciclo celular de los cultivos, se evaluó la tasa proliferativa de los tres cultivos mediante el método de exclusión por Azul Tripán. En la **Figura 2a** se muestra la evolución proliferativa de los cultivos tras la descongelación durante 96 horas. Hasta las 72 horas no se observaron diferencias significativas entre los cultivos control nanoV y nanoV respecto al cultivo de ASCs. Sin embargo, la tasa proliferativa del cultivo de ASCs fue significativamente superior (* $p < 0,05$) en los últimos puntos de análisis. Aun así, tanto el cultivo control nanoV como nanoV mostraron un buen índice proliferativo.

Así mismo, se estimó el porcentaje de células en fase proliferativa (G₂/M) y de síntesis (S) en las mismas condiciones (**Figura 2b**). Se observaron diferencias significativas entre el cultivo de ASCs y los cultivos control nanoV y nanoV en el primer análisis (0 horas), aproximadamente el 20% de la población de ASCs se encontró en fase activa, mientras los cultivos control nanoV y nanoV presentaron menores porcentajes de las fases G₂/M + S [20,6% de ASC vs. 7,41% de control nanoV (**p < 0,01) y 6,79% de nanoV (***p < 0,001)]. A las 24 horas se siguieron observando diferencias significativas entre el cultivo de ASCs y control nanoV y nanoV [38,6% de ASC vs. 13,13% de control nanoV (*p < 0,05) y 9% de nanoV (**p < 0,01)]. A partir de las 48 horas se dio un aumento de la población en fase proliferativa de los cultivos control nanoV y nanoV, y una disminución en el cultivo de ASCs [25,47% de ASC vs. 20,20% de control nanoV (*p < 0,05) y 22,95% de nanoV (p > 0,05)]. Los análisis a las 72 y 96 horas revelaron una disminución de la fase proliferativa de los tres cultivos por inhibición dada la alta confluencia de los cultivos. En ninguna de las cinco lecturas se observaron diferencias significativas entre el cultivo control nanoV y el cultivo nanoV (**Figura 2c**).

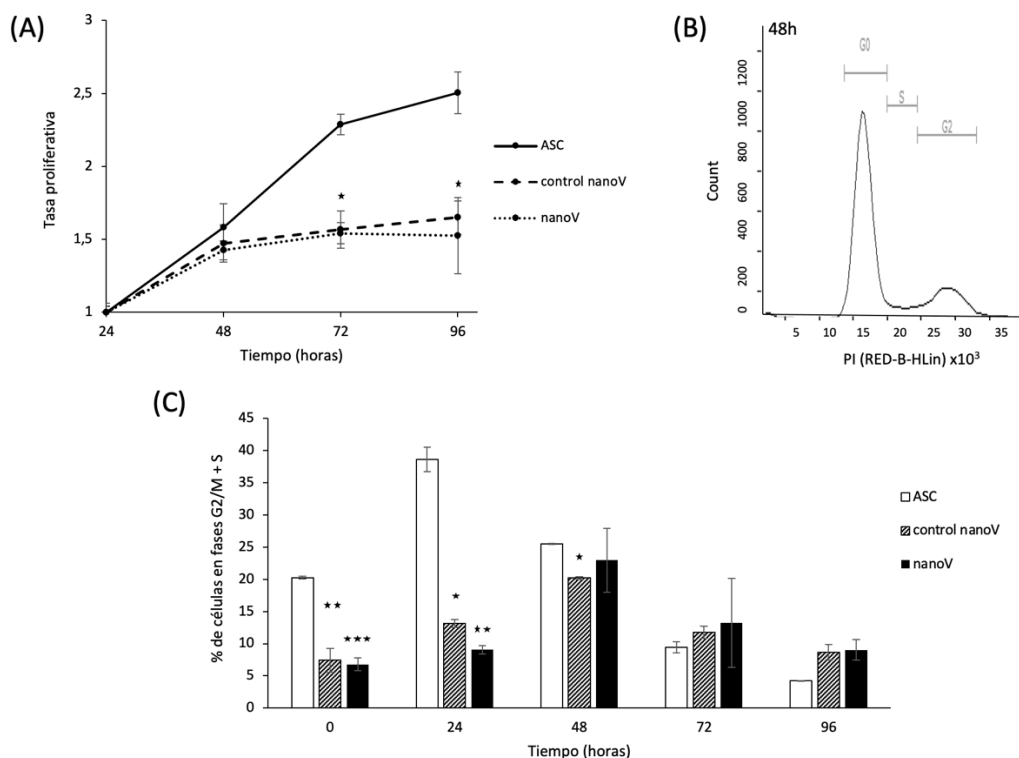


Figura 2. Análisis de la capacidad proliferativa de los cultivos control nanoV y nanoV en relación al cultivo de ASCs. A) Evolución de la tasa proliferativa (valor normalizado en relación al número de células estimadas a las 24 horas) de los cultivos ASC, control nanoV y nanoV tras la descongelación durante 96 horas. B) Imagen representativa de un histograma de ciclo celular obtenido mediante un citómetro de flujo tras la tinción con yoduro de propidio. C) Análisis de los porcentajes de las fases G₂/M + S, obtenidos por citometría de flujo, de los cultivos ASC, control nanoV y nanoV tras la descongelación durante 96 horas. No se observaron diferencias significativas entre el cultivo control nanoV y nanoV. En las gráficas se representa la media ± SD de duplicados de cada una de las muestras. Las diferencias significativas fueron establecidas a (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) respecto al cultivo de ASCs.

4.3 Determinación del carácter multipotencial de las ASCs

La capacidad de las ASCs para diferenciarse a las tres líneas mesodérmicas es una propiedad innata de este tipo de células (Dominici *et al.*, 2006). En la **Figura 3** se muestra cómo el cultivo, además de presentar capacidad adherente al plástico y una morfología fibroblástica, mostró capacidad de multipotencia para diferenciarse hacia linajes adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos bajo condiciones estándar de diferenciación de cultivos de tejidos *in vitro*.

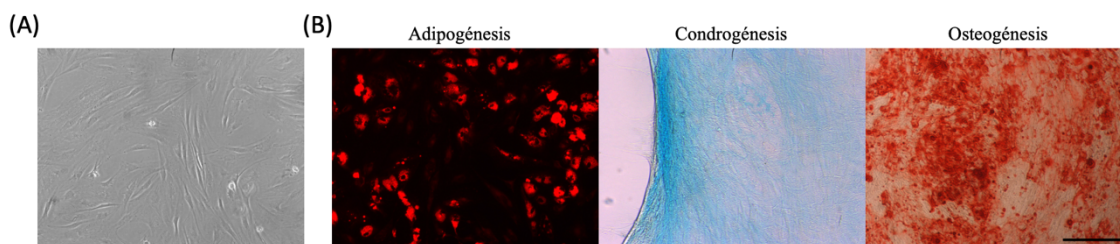


Figura 3. A) Imagen representativa de la morfología celular y de la capacidad de adhesión al plástico de las ASCs empleadas, tomada con un microscopio de contraste de fases. B) Imágenes representativas de las tinciones con AdipoRed™, Alcian Blue y Alizarin Red (bajo los títulos; Adipogénesis, Condrogénesis y Osteogénesis) tras la diferenciación a las tres líneas mesodérmicas de las ASCs con medios de diferenciación comerciales. La escala es de 200 μ m.

4.4 Evolución de la cinética de proliferación de los cultivos control nanoV y nanoV

El proceso de diferenciación osteogénica mediante el biorreactor de nanovibración, conlleva cuatro semanas de cultivo. En la **Tabla 3** se muestra la evolución de los cultivos control nanoV y nanoV, durante ese periodo de tiempo.

Tabla 3. Tabla resumen de los cultivos control nanoV y nanoV. Se muestran el número de células y porcentajes de las viabilidades obtenidas en cada uno de los pases, además del número de generaciones (n) y tiempo de replicación en días (g). Tras la descongelación (P1) los cultivos se mantuvieron durante 6 días en P2 y durante 28 días en P3.

		Células ($\times 10^6$)	Viabilidad (%)	n	g
Descongelación (P1)		5,94	75,6	-	-
Amplificación (P2)		33,31	99,3	2,5	2,4
Diferenciación osteogénica (biorreactor) (P3)	Control nanoV	92,1	98,9	3,5	7,9
	nanoV	82	98,9	3,4	8,3

Ambos cultivos mantuvieron tanto la viabilidad como los valores de tiempo de duplicación y de generaciones de las células en unos parámetros estándar para cultivos continuos de células madre mesenquimales.

En cuanto a la morfología celular (**Figura 4**), ambos cultivos presentaron un patrón morfológico acorde a los cultivos de ASCs. Además, se observaron células en división durante todo el periodo de cultivo. Por su parte, el cultivo nanoV no presentó signos de calcificación aparente en las cuatro semanas de cultivo.

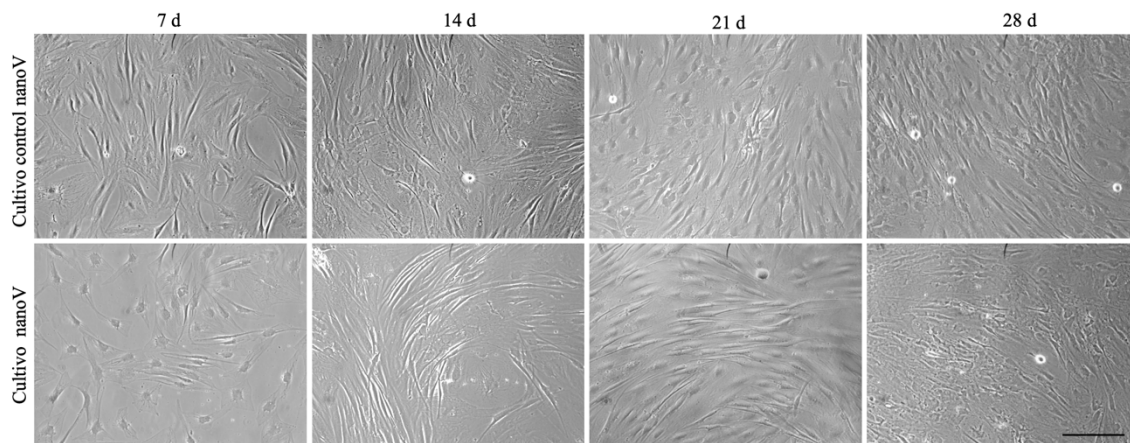


Figura 4. Imagen de microscopía de contraste de fases en la que se observa la evolución de los cultivos control nanoV y nanoV a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo. Ambos cultivos adquirieron un fenotipo fibroblástico y no se observaron signos aparentes de calcificación en el cultivo nanoV. La escala es de $200\mu\text{m}$.

4.5 Efecto de la nanovibración sobre la diferenciación osteogénica de los cultivos

4.5.1 Actividad fosfatasa alcalina

La diferenciación de células madre en osteoblastos se puede determinar examinando los niveles de la actividad fosfatasa alcalina. La actividad de esta enzima es clave en la mineralización de la matriz extracelular ósea, por ello, los niveles de fosfatasa alcalina varían en los diferentes estadios de la diferenciación osteoblástica. Los picos máximos de actividad se observan en etapas tempranas relacionadas con la diferenciación a pre-osteoblastos, y tras la fase proliferativa donde las células adquieren un fenotipo de osteoblastos diferenciado (Ullah *et al.*, 2015). Por ello, se cuantificó la actividad fosfatasa alcalina en los cultivos control nanoV, nanoV y en cultivos diferenciados con medios osteogénicos comerciales a diferentes tiempos.

Los medios osteogénicos indujeron una mayor actividad fosfatasa alcalina en los cultivos diferenciados durante 7, 14 y 21 días respecto al cultivo de ASCs, empleado como control negativo de la diferenciación (**Figura 5a**). Los picos máximos de actividad fosfatasa alcalina se observaron a los 7 y 21 días de cultivo. La actividad fosfatasa alcalina presente en el cultivo nanoV fue significativamente mayor que en el cultivo de ASCs (**Figura 5b**). Sin embargo, la actividad de este enzima fue sorprendentemente superior en el cultivo

control nanoV, alcanzando casi los valores adquiridos a los 21 días de diferenciación con medios osteogénicos.

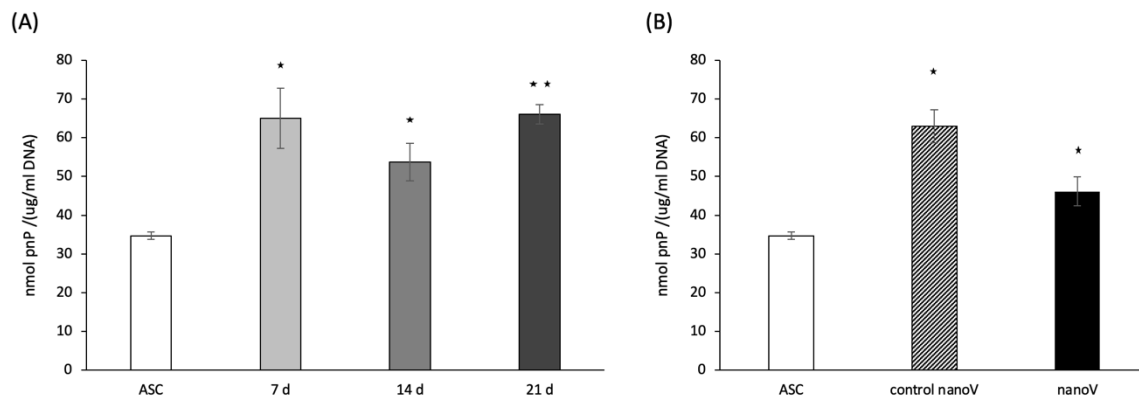


Figura 5. A) Actividad fosfatasa alcalina de cultivos diferenciados con medios osteogénicos durante 7, 14 y 21 días. B) Actividad fosfatasa alcalina de los cultivos control nanoV y nanoV. El cultivo de ASCs se tomó como control negativo de la diferenciación. En las gráficas se representa la media \pm SD de triplicados de cada una de las muestras. Las diferencias significativas, en ambos casos, fueron establecidas a (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) respecto al cultivo de ASCs.

4.5.2 Expresión génica de SPARC (osteonectina) e IBSP (sialoproteína ósea)

La osteonectina y la sialoproteína ósea son proteínas críticas involucradas en la osteogénesis. La osteonectina se expresa en etapas más tempranas de formación de la matriz ósea inmadura, mientras que la sialoproteína ósea se considera un marcador osteogénico de los estadios finales de la diferenciación osteoblástica participando en la mineralización de la matriz (Stein *et al.*, 1990). El análisis mediante q-PCR mostró cierto nivel de expresión de SPARC en el cultivo nanoV, comparado con el observado en el cultivo control nanoV (**Figura 6**). La expresión de IBSP fue nula en ambos cultivos.

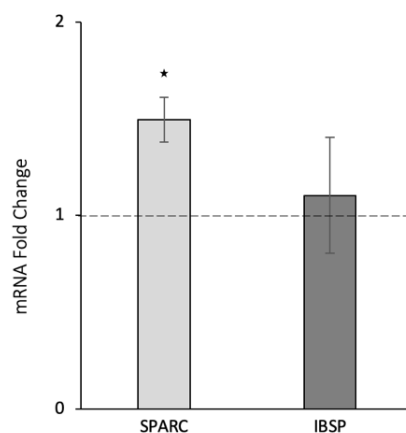


Figura 6. Expresión normalizada del mRNA del cultivo nanoV según el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para los genes SPARC e IBSP mediante q-PCR. La línea discontinua indica el valor normalizado del control nanoV. En la gráfica se representa la media \pm SD de triplicados de cada una de las muestras. Las diferencias significativas fueron establecidas a (* $p < 0,05$).

5. Discusión y conclusiones

Hoy en día, se considera que la terapia con ASCs tiene un gran potencial para la medicina regenerativa aplicada a hueso. Por ello se buscan alternativas, en relación a las condiciones de cultivo, para poder optimizar el proceso de diferenciación de las ASCs a osteoblastos *in vitro*. El objetivo principal de este trabajo ha sido llevar a cabo el escalado a nivel industrial del proceso de diferenciación osteogénica de ASCs gracias a un biorreactor de nanovibración.

Las ASCs empleadas en este proyecto fueron caracterizadas previamente con el fin de confirmar su naturaleza multipotente (**Figura 3**) y, por tanto, determinar que la línea celular empleada cumple los requisitos exigibles por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para células madre y estromales derivadas de tejido adiposo, para ser consideradas células madre mesenquimales con capacidad de diferenciación a las tres líneas mesodérmicas.

En este contexto, se quiso evaluar la influencia tanto de la nanovibración generada por el biorreactor como las cuatro semanas de cultivo sobre los cultivos de ASCs empleados. Tanto el cultivo control nanoV como las ASCs nanovibradas (cultivo nanoV) presentaron un patrón de antígenos superficiales idéntico al cultivo de ASCs (**Tabla 2**). Además, los tres cultivos se mantuvieron activos durante las cuatro semanas, tal y como lo refleja la tasa proliferativa y el análisis del ciclo celular (**Figura 2**). El hecho de no observar diferencias entre el cultivo control nanoV y el cultivo nanoV, puso de manifiesto que la posible ralentización de los cultivos pudo ser inducida por el periodo de cultivo continuo tan largo, y no por la nanovibración en sí misma. Por su parte, en las cuatro semanas de cultivo no se observó calcificación aparente en el cultivo nanoV (**Figura 4**), proceso inherente en los cultivos de osteoblastos maduros tras 21 días de diferenciación con medios osteogénicos. A este respecto, hay que tener en cuenta que la formación ósea se caracteriza por una sucesión de eventos, que comienza con el compromiso de las células madre progenitoras y su diferenciación a pre-osteoblastos y luego en osteoblastos maduros, que tienen como función sintetizar la matriz ósea mineralizada (Neve *et al.*, 2011). Todo ello sugiere que el estímulo mecánico generado por la nanovibración no provocó una diferenciación completa de las ASCs a osteoblastos.

Durante la fase de proliferación activa, los pre-osteoblastos expresan genes que fomentan la proliferación, además de varios genes que codifican para proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno tipo I y la fibronectina. Aunque las células madre precursoras de pre-osteoblastos no tienen el potencial para depositar matriz ósea, en esta primera etapa de la osteogénesis se empieza a dar un aumento de la actividad fosfatasa alcalina, clave en la mineralización de la matriz (Ullah *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron, por una parte, un nivel basal alto de esta actividad enzimática en las ASCs empleadas como control negativo. Por la otra, los niveles de actividad fosfatasa alcalina en el cultivo nanoV mostraron cierta correlación con los

valores obtenidos para los 14 días de diferenciación con medios osteogénicos (**Figura 5**), es decir, la nanovibración generada por el biorreactor podría inducir una diferenciación temprana de los cultivos, según los niveles de actividad fosfatasa alcalina. En contraposición, el cultivo control nanoV expresó prácticamente los mismos niveles de fosfatasa alcalina que los cultivos diferenciados durante 21 días con medios de diferenciación osteogénicos. Estudios como el de Barilani *et al.* (2020) reflejan que la fosfatasa alcalina es una enzima intrínseca de las células madre. Esto, junto con el posible estrés generado por las cuatro semanas de cultivo, podría explicar los niveles basales tan altos de fosfatasa alcalina en el cultivo control nanoV. Por tanto, los resultados obtenidos reflejan que este enzima no es un buen marcador para caracterizar el nivel de diferenciación osteogénica en estas condiciones de cultivo, ya que no establece claramente un resultado diferencial entre las células control nanoV y las células nanovibradas.

Así mismo, uno de los factores iniciadores más importantes de la osteogénesis es la expresión del factor de expresión Runx2 junto con factores de transcripción como la osteonectina o la proteína morfogénica ósea 2. En estadios más avanzados de la diferenciación osteoblástica, además del cese de la proliferación celular, se observa un nuevo pico de la actividad fosfatasa alcalina debido a la mineralización de la matriz extracelular. En este punto, los osteoblastos sintetizan proteínas como la sialoproteína ósea, osteopontina u osteoclastina que tienen funciones asociadas a la matriz ósea (Neve *et al.*, 2011). En consecuencia, se analizó la expresión génica de la osteonectina (SPARC) y la sialoproteína ósea (IBSP) en el cultivo control nanoV y nanoV, con el fin de comprender a nivel de expresión génica, qué grado de diferenciación induce la nanovibración. Los resultados obtenidos por q-PCR (**Figura 6**) plantearon una vez más, que este nuevo método de diferenciación promueve una pre-diferenciación osteoblástica. La nula expresión de IBSP indicó que el cultivo nanovibrado no alcanzó los estadios finales de la diferenciación osteoblástica, resultados que se vieron respaldados con la ausencia de calcificación aparente en el cultivo nanovibrado (**Figura 4**). Los niveles de expresión de SPARC en el cultivo nanoV, mostraron ese estadio pre-diferenciado del cultivo. Sin embargo, los altos niveles de SPARC observados en el cultivo control nanoV, hacen necesario analizar con más detalle la expresión de este marcador en distintas líneas celulares.

Todos los ensayos de caracterización se llevaron a cabo tras la descongelación de los cultivos, ya que el producto final se espera comercializar en ese formato. Aunque los resultados obtenidos son preliminares, habría que estudiar el posible efecto de la criopreservación sobre los parámetros analizados. Aun así, desde un punto de vista de terapia celular, el hecho de que la nanovibración induzca una pre-diferenciación y no una diferenciación completa de los cultivos, permitiría cierta proliferación en el sitio de implantación y junto con la activación de las células precursoras residentes podrían obtenerse resultados prometedores. Sin embargo, es necesario analizar el resultado que induce la nanovibración en líneas celulares de otros donantes para asegurar la reproducibilidad del proceso y corroborar los resultados obtenidos en este trabajo.

Además, es necesario realizar una búsqueda de nuevas vías, u optimizar las existentes, para la caracterización de los cultivos que permitan determinar, con la suficiente claridad y exactitud, el nivel de diferenciación osteogénica que se ha inducido mediante este nuevo método de cultivo.

6. Bibliografía

Amini, A. R., Laurencin, C. T., Nukavarapu, S. P. 2012. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical reviews in biomedical engineering*, 40(5), 363–408. doi: 10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10

Barba, M., Di Taranto, G., Lattanzi, W. 2017. Adipose-derived stem cell therapies for bone regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 17(6):677-689. doi: 10.1080/14712598.2017.1315403

Barilani, M., Cherubini, A., Peli, V., Polveraccio, F., Bollati, V., Guffanti, F., ..., Lazzari, L. 2020. A circular RNA map for human induced pluripotent stem cells of foetal origin. *EBioMedicine*, 57, 102848. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102848

Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., ..., Gimble, J. M. 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641–648. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006

Campsie, P., Childs, P. G., Robertson, S. N., Cameron, K., Hough, J., Salmeron-Sánchez, M., Tsimbouri, ... M. J., Reid, S. 2019. Design, construction and characterisation of a novel nanovibrational bioreactor and cultureware for osteogenesis. *Scientific Reports*, 9(1), 12944. doi: 10.1038/s41598-019-49422-4

Daar, A.S., Greenwood, H.L. 2007. A proposed definition of regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(3):179-84. doi: 10.1002/term.20

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, ... D. J., Horwitz, E. M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905

García-Gareta, E., Coathup, M.J., Blunn, G.W. 2015. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, 81:112-121. doi: 10.1016/j.bone.2015.07.007

Grottkau, B. E., Lin, Y. 2013. Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells. *Bone research*, 1(2), 133–145. doi: 10.4248/BR201302003

Haugen, H.J., Lyngstadaas, S.P., Rossi, F., Perale, G. 2019. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology*, 46 Suppl 21:92-102. doi: 10.1111/jcpe.13058

Janicki, P., Schmidmaier, G. 2011. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, 42 Suppl 2:S77-81. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.014

Ma, T., Sun, J., Zhao, Z., Lei, W., Chen, Y., Wang, X., Yang, J., Shen, Z. 2017. A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Stem Cell Research & Therapy*. 8(1):124. doi: 10.1186/s13287-017-0585-3

Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., Malka, G. 2019. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2523. doi: 10.3390/ijms20102523

Morcos, M. W., Al-Jallad, H., Hamdy, R. 2015. Comprehensive Review of Adipose Stem Cells and Their Implication in Distraction Osteogenesis and Bone Regeneration. *Biomed Research International*, 2015:842975. doi: 10.1155/2015/842975

Myeroff, C., Archdeacon, M. 2011. Autogenous bone graft: donor sites and techniques. *Journal of Bone and Joint Surgery Am*, 93(23):2227-36. doi: 10.2106/JBJS.J.01513

Neve, A., Corrado, A., Cantatore, F.P. 2011. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and Tissue Research*, 343(2):289-302. doi: 10.1007/s00441-010-1086-1

Riazi, A.M., Kwon, S.Y., Stanford, W.L. 2009. Stem cell sources for regenerative medicine. *Methods in Molecular Biology*, 482:55-90. doi: 10.1007/978-1-59745-060-7_5

Salazar, G.T., Ohneda, O. 2013. Review of biophysical factors affecting osteogenic differentiation of human adult adipose-derived stem cells. *Biophysical Reviews* 5, 11–28. doi: 10.1007/s12551-012-0079-6

Shafaei, H., Kalarestaghi, H. 2020. Adipose-derived stem cells: An appropriate selection for osteogenic differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 235(11):8371-8386. doi: 10.1002/jcp.29681

Sohn, H.S., Oh, J.K. 2019. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomaterials Research*, 23(9). doi: 10.1186/s40824-019-0157-y

Stein, G.S., Lian, J.B., Owen, T.A. 1990. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *The FASEB Journal*, 4(13):3111-23. doi: 10.1096/fasebj.4.13.2210157

Thurairajah, K., Broadhead, M. L., Balogh, Z. J. 2017. Trauma and Stem Cells: Biology and Potential Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 577. doi: 10.3390/ijms18030577

Ullah, I., Subbarao, R.B., Rho, G.J. 2015. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2):e00191. doi: 10.1042/BSR20150025