



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

María  
Guillán Fresco

Tesis doctoral

Regulación fisiológica y  
fisiopatológica de la  
diferenciación osteoblástica:  
osificación heterotópica

Santiago de Compostela, 2023

**Programa de doctorado en Medicina Molecular**





TESIS DE DOCTORADO

**REGULACIÓN FISIOLÓGICA Y  
FISIOPATOLÓGICA DE LA  
DIFERENCIACIÓN OSTEÓBLÁSTICA:  
OSIFICACIÓN HETEROTÓPICA**

María Guillán Fresco

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR



SANTIAGO DE COMPOSTELA

2023



D./Dna. **María Guillán Fresco**

Título da tese: **Regulación fisiolóxica y fisiopatolóxica de la diferenciación osteoblástica: osificación heterotópica**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela, 16 de Novembro de 2022.**

**Sinatura electrónica**

D./Dna. **Rodolfo Gómez Vaamonde**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: **Regulación fisiológica y fisiopatológica de la diferenciación osteoblástica:  
osificación heterotópica**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna María Guillán Fresco, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 16 de Novembro de 2022**

**Sinatura electrónica**

D./Dna. **Juan Antonio Suárez Quintanilla**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: **Regulación fisiológica y fisiopatológica de la diferenciación osteoblástica:  
osificación heterotópica**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna María Guillán Fresco, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 16 de Novembro de 2022**

**Sinatura electrónica**

D./Dna. **Anxo Vidal Figueroa**

En condición de: **Titor/a**

Título da tese: **Regulación fisiolóxica y fisiopatolóxica de la diferenciación osteoblástica:  
osificación heterotópica**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna María Guillán Fresco, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 16 de Novembro de 2022**

**Sinatura electrónica**



## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES Y FINANCIACIÓN

La autora **María Guillán Fresco** declara no tener ningún conflicto de interés en la realización de esta tesis doctoral.

El trabajo de esta tesis doctoral ha recibido financiación del Instituto de Salud Carlos III cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (CP15/00007, PI16/01870, PI19/01446), la Fundación Mutua Madrileña (MMA2018\_2), y el Ministerio de Universidades (Ayudas para la formación de profesorado universitario – FPU 2017).

Así consta en Santiago de Compostela, a 16 de noviembre de 2022.

Autora: María Guillán Fresco

Director: Rodolfo Gómez Vaamonde

Director: Juan Antonio Suárez Quintanilla





## DECLARACIÓN DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA

La autora **María Guillán Fresco** declara poseer la autorización del Comité de ética de la investigación de Santiago-Lugo para el trabajo “Búsqueda de factores solubles implicados en la osificación heterotópica asociada al traumatismo craneoencefálico” del promotor Dr. Rodolfo Gómez Vaamonde el 22 de mayo de 2017.

Así consta en Santiago de Compostela, a 16 de noviembre de 2022.

Autora: María Guillán Fresco

Director: Rodolfo Gómez Vaamonde

Director: Juan Antonio Suárez Quintanilla





## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE IMÁGENES Y FIGURAS

La autora **María Guillán Fresco** declara que todas las imágenes y figuras incluidas en la tesis doctoral “Regulación fisiológica y fisiopatológica de la diferenciación osteoblástica: osificación heterotópica” son de autoría propia.

Así consta en Santiago de Compostela, a 16 de noviembre de 2022.

Autora: María Guillán Fresco





## AGRADECIMIENTOS

Quen me diría a min que chegaría o día no cal estaría escribindo os agradecementos, momento tan esperado polo que significa e, á súa vez, tan agridoce xa que supón a fin dunha etapa que sen dúbida marcou a miña vida. Quizás sexa como un neno que quere cumprir anos para poder facer “ cousas de maiores ” e logo cando chega o momento e ve que os anos pasan seguindo unha relación logarítmica, xa non fai tanta gracia. Pero o que si podo dicir é que durante esta infancia predoutoral desfrutei moito e isto foi posible grazas á gran tripulación que compón o grupo de Patoloxía Musculoesquelética.

Por elo, quero agradecerlle en primeiro lugar a Ruddy, o capitán do barco que sempre rema en contra das tempestades e que ten por lema “ *al trabajo hay que venir contentos* ”. Grazas por brindarme a oportunidade de formarme con vós. Non che importou que fose unha fisioterapeuta sen formación científica básica. Simplemente me dixeches que igual nos levaba un pouco máis de tempo ó principio pero logo todo se andaría. Finalmente, a cousa non foi tan mal e, coas túas explicacións un tanto curiosas pero á súa vez altamente instrutivas, conseguiches que entendese todo á perfección e lograr o que hoxe en día son a nivel científico. A parte do que compete ó eido científico, teño moito máis que agradecerche, porque tamén me formaches a nivel persoal. Sempre dixen que, aínda que non o saibas, tes un dobre grao: Farmacia e Psicoloxía. Grazas de corazón por perder o tempo tan valioso como IP, e escoitar ós teus doutorandos, brindarlles axuda a nivel persoal e entender que os estudantes tamén somos persoas e que o que nos sucede nas vidas privadas repercute no noso traballo. Unha vez dixen unha frase que non todos os IPs poderán escoitar “ o único que me molesta do traballo é o camiño ” (poñamos en contexto que avenida de Barcelona cando chove é dura). Volvería a dicir mil veces e creo que á súa vez di moito de ti, tanto como IP como persoa. Grazas por todo Ruuuuu!

Outro dos pilares importantísimos do grupo é Vero, a gran patroa e temoneira experta en dar abrazos cando máis se precisan. Tiven a gran sorte de formarme contigo nos estadios iniciais da miña etapa como estudante predoutoral. Se o que sae de min che gusta, que saibas que é un reflexo do que ti un día me ensinaches. Grazas pola túa paciencia infinita e axudarme tanto sobre todo cando máis o precisaba. A parte disto, teño que resaltar os grandes momentos que pasamos xuntas no laboratorio: risas, cotilleos, choros, etc. É un gusto

traballar con xente coma ti. A túa labor resumiríase no cantar de xesta difundido polos estudantes titulado “O que di Vero, vai a misa”.

Non menos importante nesta gran viaxe foron o resto da tripulación. O primeiro en chegar foi Eloi, o responsable dos congresos e relacións internacionais do barco. Cóntame que foi en parte grazas a ti o motivo polo cal eu cheguei a este grupo (aínda recordo coma se fose hoxe aquela entrevista). Grazas por estar sempre disposto a axudar de maneira altruísta e a integrar ós novos “*fichajes*” na sociedade científica. Non podo rematar esta sección sen darche as grazas por todos eses momentos que nos deches, os cales non vou a mencionar pero que todos sabemos do que falo.

Outro membro indispensable desta tripulación é Ana. Probablemente con todo o que che teño que agradecer puidese facer unha nova tese. Pero sendo concisa, grazas pola túa paciencia, por ensinarme de ciencia, de *Excel*, de *Word*... Nunca hai un “non” pola túa parte e que saibas que o teu positivismo contaxia. Tiven a gran sorte de conxeniarme contigo dende o primeiro momento, marcándonos momentos como os de *Phil* e *Lil* ou Vaca e Polo, e, por suposto, non esquecernos de Mari Charil. Somos de humor básico, pero grazas a isto os días no laboratorio lévanse mellor. Sabes que os cargos que se che asignan abordo deste navío son múltiples, aínda que eu daríache o de primeiro oficial. Por iso non podes faltar nunca.

Tamén cabe destacar a importancia das novas xeracións. Debido á alta curiosidade científica, a primeira en caer nas redes foi Miriam. A ti teño que agradecerche eses arrebatos que de vez en cando te caracterizan, cos cales nos fas rir a máis non poder. Pero ademais, contigo compartín momentos máis persoais, e pouco a pouco fun descubrindo a outra Miriam, que aínda me gusta máis. Especial mención merecen as comidas/ceas e festas que vivimos xuntas. E as que están por vir!

Outra boa captura foi a de Andrés, experto en estatística e no mundo da electrónica que tantos cables me botou. É increíble que aínda non saíses das túas casillas explicándolle cousas básicas a unha persoa maior coma min. Pero e que se tes algo que te caracteriza é a serenidade e a paciencia. Grazas por axudarme nos aspectos máis abstractos para min, e por compartir comigo a aventura dos *ficoles*!

Por último, o criterio clínico e a sabedoría das inmortalizacións petaron na nosa escotilla. A Antía, grazas por axudarme a consultar e aclarar os aspectos máis clínicos. Tamén grazas por estar sempre disposta a axudar cando o resto non estamos nas mellores condicións de saúde e ser unha médica das que saben escoitar. A María, a incansable traballadora encargada das “chapas” europeas,

grazas por ter a paciencia de ensinarme cousas que para ti son básicas, e para min non o son tanto. Tamén grazas por compartir connosco ese humor que tanto te caracteriza e facernos a todos partícipes del.

Aínda que non sexa unha nova incorporación, teño que agradecerlle a Alberto a súa dedicación co grupo e o feito de que sempre estea velando polo noso benestar.

Finalmente, agradecerlle a Susana e Pili da unidade de proteómica a súa disposición para axudarme sempre e facilitar que os grupos con máis desvantaxes poidan seguir realizando ciencia de calidade.

Botando un pé fóra do barco e pisando terra firme, atópanse outras figuras indispensables, capaces de virar os ventos e cruciais para facer que o barco navegase na dirección correcta.

En primeiro lugar agradecerlles a meu pai e miña nai por todo o apoio brindado non só durante estes cinco anos de tese, senón durante toda a miña etapa formativa. Grazas a eles, fun quen de explotar as miñas inquedanzas e virtudes. Sen este apoio, non sería posible chegar ata onde cheguei hoxe, polo que podemos consideralo como un logro conxunto. Parte deste éxito débollo tamén a meu irmán, o cal a pesares de meterse comigo polos resultados académicos obtidos, sempre me botou unha man en todo o que precisei afianzándose coma un pilar de apoio clave para seguir adiante coa miña formación.

Mención a parte correspóndelle á miña avoa Clotilde, defensora férrea da formación académica con frases célebres como “ti estudia miña meniña”, ou “ti podes acabar barrendo o chan, pero un barrendeiro nunca poderá facer o que ti fas”. A pesares de que debido ás circunstancias non poidas festexar connosco este logro, sei que dende algún lugar o estarás facendo. A ninguén tanto coma ti lle gustaría vestir un bo traxe e vir ver como a túa neta se converte en doutora. A ti teño que agradecerche tanto que non se pode resumir en tan poucas liñas. Que saibas que es a responsable do organizada, cuadriculada e da perfección que sempre persigo, o cal non me parece negativo sempre e cando saiba dobregarme coma un xunco (*Rodolfo Gómez, 2018*). A túa axuda vén dende o berce, cando incluso de ben pequena pasabas parte das noites tomándome a lección. Deste modo fuches cimentando o que a día de hoxe son. E os logros que acadei, acado e acadarei serán sempre compartidos contigo.

Outro dos compoñentes imprescindibles para facer fronte ós momentos de mareas vivas e tormentas mariñas foron os amigos. Especialmente, gustaríame citar a Efrén, Noe e Diego. A pesares da distancia, eles foron quen de estar

sempre aí preto, axudándome a superar eses alti-baixos puntuais, para ver a vida con máis “*janja*”. Por favor, que esas risas e bos momentos non nos falten nunca!. Do mesmo xeito, teño que agradecerlle a Gonzalo por facerme ver e darlle importancia a pequenos momentos da vida coma os que che brinda unha copa de viño cun pouco de queixo. Din que o que ten un amigo ten un tesouro, e eu non teño motivos nin vou ser quen para levar a contraria.

Dado que esta é unha tese internacional, a partires de agora escribirei un pequeno parágrafo en inglés para agradecerlle ó meu compañeiro de navegación todo o apoio recibido durante estes anos. To James, thank you for sticking by me during this marathon and accelerating the calm arrival after the storm. Thank you for teaching me to organize my life crashes with advice such as “step by step”, although sometimes this means “you need a chill pill”. Thank you for your dedication and contribution to improving my work quality, which helped me to become what I am today. But above all, thank you for your positivism and the smiles in the worst moments. Life with you is better. Finally, I would like to thank James' family for all the support during this journey.

Creádelo ou non, esta parte levoume tres horas e pico escribila. É o resumo de cinco anos cheos de sentimentos, algunha que outra lágrima e moitas risas.

Como conclusión só podoo dicir unha cousa: non me arrepeno do cambio de rumbo que tomei a nivel educativo. Considero que foi complementario e enriquecedor a nivel persoal e académico. Todo o que me levo é positivo e síntome tremendamente afortunada de atoparvos no meu camiño. Só podoo dicir unha cousa: sigamos navegando grumetes! Grazas por todo e a todos de corazón.

En Coaxe, a 17 de novembro de 2022

## **RESUMEN/ABSTRACT**

## RESUMEN

La osificación heterotópica (OH) es, por definición, la formación de hueso laminar maduro mediante procesos de osificación endocondral y/o intramembranosa en tejidos blandos extra-esqueléticos. Clínicamente, no existe ningún signo patognomónico que permita establecer el diagnóstico temprano de esta enfermedad, basándose el mismo en la recopilación de signos y síntomas clínicos no específicos de la patología. Actualmente, la etiopatogenia de esta enfermedad no está del todo esclarecida. Sin embargo, existen ciertos factores de riesgo que favorecen su aparición. Entre ellos destacan las lesiones neurológicas, fracturas, cirugía de reemplazo articular, etc.

Atendiendo a la etiología de esta enfermedad, la OH se puede clasificar en OH congénita o adquirida. Las variantes congénitas, como la fibrodisplasia osificante progresiva (FOP) y la heteroplasia ósea progresiva (HOP) son enfermedades raras y consideradas como las formas más graves de la patología. Por su parte, la OH adquirida se trata de la modalidad de OH más frecuente. Esta, a su vez, puede clasificarse en OH adquirida de origen traumático o neurogénico (OHN).

La OHN es una de las complicaciones más frecuentes derivada de un daño en el Sistema Nervioso Central (SNC). Este tipo de OH se desarrolla normalmente tras un politraumatismo en el cual estructuras centrales y periféricas están involucradas, como sucede en el caso de un traumatismo craneoencefálico (TCE) asociado a fracturas óseas concomitantes, o en una lesión medular.

La etiopatogenia de la OHN se desconoce a día de hoy. Sin embargo, algunas de las hipótesis actuales se centran en un posible efecto aditivo de los factores humorales neuroinmunológicos que alcanzan las estructuras periféricas debido a una alteración en la barrera hematoencefálica (BHE) producida por un TCE, y de los factores locales liberados tras el traumatismo. Asimismo, otro de los factores que podrían estar relacionados con el desarrollo de esta enfermedad sería la presencia de precursores osteoblásticos y células circulantes en sangre con potencial osteoformador.

Recientemente, se ha vinculado la posible implicación del Sistema Nervioso Periférico (SNP) con el desarrollo de masas ectópicas. En concreto, se ha postulado que las alteraciones en la barrera hematonerviosa (BHN) producidas tras un traumatismo podrían estar relacionadas con el incremento en la

incidencia de esta enfermedad. Asimismo, otros estudios han sugerido el origen de los progenitores osteoblásticos a nivel del nervio.

A pesar de la elevada incidencia de esta patología, las terapias actuales para abordarla son escasas, poco efectivas y algunas de ellas altamente invasivas. Además, no están exentas de efectos adversos y complicaciones.

Ante esta situación, nos planteamos la hipótesis de que los astrocitos y nervios podrían liberar al medio factores osteoinductores que podrían favorecer la formación de hueso ectópico. Asimismo, sugerimos que en el suero de los pacientes en riesgo de padecer OHN existen factores responsables de las propiedades osteoinductoras del mismo y que podrían desempeñar un papel clave en la formación ósea ectópica. Finalmente, nos planteamos la hipótesis de que fármacos utilizados en la práctica clínica con un perfil “osteoinhibidor” podrían bloquear los procesos osteoformadores presentes en los pacientes con riesgo de padecer OHN.

A raíz de estas hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Establecer un modelo de OHN *in vitro* válido que permita el estudio de la patología.
2. Determinar *in vitro* la capacidad de los astrocitos de liberar factores osteoinductores y caracterizar mediante proteómica los factores secretados.
3. Determinar *in vitro* la capacidad de los nervios y células nerviosas de liberar factores promotores del anabolismo óseo y caracterizar mediante proteómica los factores liberados por los mismos.
4. Determinar *in vitro* el potencial osteoinductivo del suero de pacientes en riesgo de padecer OHN e identificar y/o aislar los principales factores humorales presentes en el suero de estos pacientes mediante proteómica.
5. Estudiar el bloqueo farmacológico de los posibles efectos osteoinductivos de los factores humorales identificados.

Para llevar a cabo estos objetivos se realizaron diferenciaciones de osteoblastos y células madre mesenquimales (*MSCs*) a adipocito en presencia o ausencia de astrocitos o bien del secretoma de los mismos. Del mismo modo, se llevaron a cabo diferenciaciones de osteoblastos y *MSCs* a adipocito en presencia o ausencia de explantes nerviosos (EN) procedentes de donantes humanos, o de las células derivadas de los EN (CEN). Estos procesos fueron evaluados mediante el análisis de la expresión génica de los marcadores de osteoblastogénesis, inflamación y adipogénesis.

En general, los resultados obtenidos evidenciaron un efecto promotor del anabolismo óseo e inflamación por parte de los astrocitos, EN y CEN en las

diferenciaciones osteoblásticas. En relación con la inflamación, el presente estudio ha demostrado cómo la presencia de un estímulo inflamatorio externo como la interleuquina 1 $\beta$  (*IL1 $\beta$* ) fue capaz de potenciar tanto los marcadores inflamatorios como los anabólicos asociados con la OH. Asimismo, estas células nerviosas redujeron los marcadores adipogénicos esenciales en la diferenciación de las *MSCs* a adipocito, y promovieron la expresión de los genes relacionados con el metabolismo óseo en el proceso de adipogénesis.

Como resultado de la caracterización proteómica de los secretomas de astrocitos, nervios, del medio de diferenciación de SaOS2 (MD) y del medio de nervio (MN) se evidenció la presencia de una proteína (resultados afectados por la protección de derechos) altamente expresada en los sobrenadantes de las células nerviosas.

En línea con lo descrito en la literatura, los estudios proteómicos realizados con los sueros de los pacientes elucidaron el potencial osteoinductor del suero de los pacientes con mayor riesgo de padecer OHN (TCE+FHL).

Finalmente, en esta tesis doctoral se testó el efecto de la triterapia (TT) en el modelo de OHN *in vitro* desarrollado tanto con componente central como periférico. A pesar de algunas idiosincrasias entre ambos modelos, la TT redujo en los osteoblastos los principales marcadores óseos relacionados con la OH, así como el perfil inflamatorio desencadenado por los astrocitos y nervios en los mismos.

En relación con los datos obtenidos, se puede concluir que los factores liberados por los astrocitos y nervios alteran el metabolismo óseo a través del balance osteoblastogénesis-adipogénesis, en detrimento de este último. Asimismo, los efectos de los astrocitos y EN sobre la osteoblastogénesis podrían ser modulados mediante el uso de la TT.

## ABSTRACT

The term Heterotopic Ossification refers to the presence of mature lamellar bone in extra-skeletal soft tissue. The bone growth can occur through endochondral or intramembranous ossification mechanisms.

Clinically, there are no pathognomonic signs to establish an early diagnosis of this disease. Thus, its diagnosis is mainly based on non-specific signs and symptoms.

Currently, the etiopathology of this disease is not fully elucidated. However, some risk factors contribute to its development. Among them, neurogenic insults, fractures, or joint replacements should be highlighted.

According to its aetiology, this disease can be classified as genetic or acquired heterotopic ossification. Genetic variants (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva and Progressive Osseous Heteroplasia) are rare diseases and considered the most severe heterotopic ossification manifestations. Regarding non-hereditary forms, they represent the most frequent heterotopic ossification variant. The acquired heterotopic ossification can develop after traumatism or a neurogenic insult.

The neurogenic heterotopic ossification is one of the most frequent complications of suffering an injury in the Central Nervous System. According to this, it has been demonstrated that its incidence increases after concomitant Central Nervous System damage, such as a traumatic brain injury or spinal cord injury, and a peripheral injury, such as a long bone fracture.

The pathophysiology of neurogenic heterotopic ossification remains unknown. Nonetheless, it has been hypothesised that the humoral neuroimmunological factors released by the brain could play a critical role in developing this disease. After a traumatic brain injury, the blood-brain barrier is compromised, and some neurogenic factors leak from the brain to distal tissues. At the same time, distal tissues located close to the fracture secrete other factors to promote bone healing. Thus, it was suggested that the convergence of these two factors could potentiate abnormal bone growth. Likewise, studies pointed to osteoblast precursors and circulating cells with osteoforming capacity as potential factors to accelerate ectopic bone formation.

Recently, the Peripheral Nervous System has also been postulated as a promoter of heterotopic bone. Specifically, studies linked the disruption of the blood-nerve barrier with increased neurogenic heterotopic ossification

incidence. Additionally, the presence of osteoblast precursors in nerves has also been suggested.

Even though there is a high incidence of this pathology, the therapies used for its management have low-effective rates. Moreover, some of them are highly invasive and associated with side effects and complications.

Given this situation, we hypothesised that astrocytes and nerves could release osteoinductive factors into the environment that could lead to ectopic bone formation. Likewise, we suggested that in the serum of patients at risk of developing neurogenic heterotopic ossification, there are osteoinductive factors that could play a key role in ectopic bone formation. Finally, we hypothesised that "osteoinhibitory" drugs currently used in clinical practice could block bone formation in these patients.

Taking into account these hypotheses, we formulated the following aims:

1. To establish a valid *in vitro* neurogenic heterotopic ossification model that allows the study of the pathology.
2. To determine the capacity of astrocytes to release osteoinductive factors *in vitro*, and characterise them by proteomics.
3. To determine the capacity of nerves and nerve cells to release factors that promote bone anabolism *in vitro*, and characterise them by proteomics.
4. To determine, identify and/or isolate the potential osteoinductive factors present in patients at risk of developing neurogenic heterotopic ossification serum by proteomics.
5. To pharmacology block the identified osteoinductive factors.

To carry through these objectives, osteoblast-like cells and mesenchymal stem cells were differentiated into osteoblasts and adipocytes, respectively, in the presence or absence of astrocytes or their secretome. In the same way, osteoblast-like cells and mesenchymal stem cells were differentiated into osteoblasts and adipocytes in the presence or absence of nerve explants and outgrowth nerve cells. The gene expression of bone, inflammation, and adipocyte-related markers were evaluated.

Overall, the obtained results showed the ability of astrocytes, nerve explants, and outgrowth nerve cells to increase bone and inflammatory-related markers on osteoblastogenesis. Regarding inflammation, this study demonstrated that adding an external inflammatory stimulus such as IL1 $\beta$  can increase the inflammatory and anabolic markers associated with heterotopic ossification. Likewise, these nervous cells decreased essential adipogenic markers and

increased the expression of bone-related markers on mesenchymal stem cells differentiated into adipocytes.

The proteomic characterization of astrocyte and nerve supernatants, the SaOS2 differentiation medium, and the nerve medium revealed a higher expression of the “X” protein (results affected by the protection of rights).

Moreover, proteomic analysis of the serum of patients at risk of developing neurogenic heterotopic ossification elucidated a higher osteoinductive profile in double trauma patients when compared to the rest of the groups.

Finally, the effect of the tritherapy was tested on the *in vitro* neurogenic heterotopic ossification models (co-culture of astrocytes or nerve explants with osteoblasts). Although there were some differences between the two models, the tritherapy decreased the expression of bone and inflammatory markers induced by the astrocytes and nerve explants in osteoblasts.

In conclusion, astrocytes and nerve explants impact bone metabolism by altering the osteoblastogenesis-adipogenesis balance by promoting osteoblastogenesis. Additionally, the observed effects of astrocytes and nerve explants on osteoblastogenesis could be modulated using the tritherapy.

## ÍNDICE



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	7
Fisiología nerviosa.....	9
1. El Sistema Nervioso.....	9
2. Clasificación del Sistema Nervioso.....	9
2.1. El Sistema Nervioso Central.....	9
2.2. El Sistema Nervioso Periférico .....	13
3. Composición del Sistema Nervioso .....	15
3.1. Las neuronas.....	15
3.2. Las células gliales .....	16
Fisiología ósea.....	19
1. El hueso .....	19
2. Clasificación de los tipos de hueso .....	19
3. Composición del hueso .....	20
3.1. Células .....	20
3.2. Matriz ósea.....	22
4. El proceso de osificación .....	22
4.1. Tipos de osificación.....	23
5. El metabolismo del hueso.....	26
5.1. Modelado y remodelado óseos .....	26
Patología del hueso y del Sistema Nervioso: la Osificación Heterotópica	32
1. La Osificación Heterotópica.....	32
1.1. Fisiopatología de la Osificación Heterotópica .....	34
1.2. Etapas en la formación del hueso ectópico .....	36
2. Clasificación de la Osificación Heterotópica .....	36
2.1. Clasificación de la Osificación Heterotópica según la extensión y localización de la masa ósea .....	36
2.2. Clasificación de la Osificación Heterotópica según su etiología	37
3. Abordaje terapéutico de la Osificación Heterotópica .....	41
3.1. Profiláctico.....	41
3.2. Tratamiento .....	43
ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	45
Antecedentes e hipótesis.....	47
Objetivos .....	48

MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
Material y métodos.....	51
1. Muestras sanguíneas.....	51
1.1. Obtención de suero y plasma de pacientes.....	51
2. Cultivos celulares.....	53
2.1. Línea celular CCF-STTG1 .....	53
2.2. Línea celular SaOS2.....	54
2.3. Línea celular C3H10T1/2 .....	54
2.4. Línea celular ATDC5.....	55
2.5. Aislamiento y cultivo primario de células procedentes de nervio periférico .....	55
3. Diferenciación celular.....	57
4. Cocultivos celulares.....	60
4.1. Cocultivos celulares de CCF-STTG1 y SaOS2 .....	60
4.2. Cocultivos celulares de explantes nerviosos y SaOS2.....	60
4.3. Cocultivos celulares de células procedentes de los explantes nerviosos y SaOS2 .....	61
5. Cultivos celulares con medios condicionados .....	61
5.1. Obtención de los medios condicionados.....	61
5.2. Cultivos celulares con los medios condicionados.....	62
6. Tratamientos .....	64
6.1. Tratamientos con estímulos inflamatorios .....	64
6.2. Apartado afectado por la protección de derechos.....	64
6.3. Triterapia.....	64
7. Estudio de la viabilidad celular.....	65
7.1. Estudio de la viabilidad celular mediante la cuantificación del ácido ribonucleico y contaje celular.....	65
7.2. Estudio de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT .....	65
8. Tinciones .....	66
8.1. Tinción del citoesqueleto y núcleo celular <i>in vivo</i> .....	66
8.2. Tinción rojo de aceite O.....	67
9. Aislamiento del ARN.....	67
10. Estudios de expresión génica .....	68
10.1. Retrotranscripción.....	68

10.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real .....	69
11. Estudios de expresión proteica .....	73
11.1. <i>Western Blot</i> .....	73
11.2. Estudios de proteómica.....	75
12. Análisis estadístico .....	75
13. Listado de líneas celulares, anticuerpos y reactivos .....	77
RESULTADOS.....	81
1. Efecto de los astrocitos en la osteoblastogénesis .....	83
1.1. Estudio del efecto anabólico de los astrocitos sobre los osteoblastos.....	83
1.2. Determinación del efecto inflamatorio del medio condicionado por los astrocitos sobre los osteoblastos.....	91
1.3. Determinación de los cambios morfológicos celulares inducidos por el medio condicionado por los astrocitos .....	95
2. Efecto del medio condicionado por los astrocitos en la adipogénesis .....	96
3. Efecto de los explantes nerviosos en la osteoblastogénesis .....	101
4. Efecto del medio condicionado por los explantes nerviosos en la adipogénesis.....	114
5. Apartado afectado por la protección de derechos .....	118
6. Apartado afectado por la protección de derechos .....	118
7. Apartado afectado por la protección de derechos .....	118
8. Uso de la triterapia como terapia preventiva frente a la Osificación Heterotópica Neurogénica.....	118
DISCUSIÓN .....	128
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	138
ANEXOS .....	142
Índice de anexos .....	144
Anexo I: Índice de figuras.....	146
Anexo II: Índice de tablas.....	148
Anexo III: Listado de proteínas.....	149
Anexo IV: Listado de abreviaturas .....	151
Anexo V: Dictamen del comité de ética.....	154
BIBLIOGRAFÍA.....	156



## INTRODUCCIÓN



## FISIOLOGÍA NERVIOSA

### 1. EL SISTEMA NERVIOSO

El Sistema Nervioso (SN) se puede considerar como uno de los sistemas más complejos del cuerpo humano. El SN es el responsable de todas las actividades que el ser humano puede llevar a cabo. Gracias a él, somos capaces de percibir cambios fisiológicos internos, interactuar con el mundo que nos rodea y generar respuestas acorde con la información procedente del organismo y del exterior. Asimismo, el SN controla todas las funciones vitales, además de aspectos como la personalidad, la inteligencia, la coordinación, o la percepción, entre otras (1,2).

### 2. CLASIFICACIÓN DEL SN

#### 2.1. El SN Central

El SN Central (SNC) está formado por el encéfalo y la médula espinal. Dado que el SNC es el centro regulador de todas las funciones del organismo, éste se encuentra altamente protegido por estructuras óseas como el cráneo, en el caso del encéfalo, y la columna vertebral, en el caso de la médula espinal (1,2). Además, el SNC cuenta con otras estructuras más específicas que refuerzan inmunológicamente dicha protección: las meninges y la barrera hematoencefálica (BHE) (2,3).

##### 2.1.1. Las meninges

Tanto el encéfalo como la médula espinal se encuentran rodeados por una triple membrana, conjuntamente conocida como meninges: la duramadre, aracnoides y piamadre (2,3).

La duramadre es una membrana gruesa, compuesta a su vez por dos capas: la perióstica, localizada adyacente al cráneo, y la meníngea localizada próxima al cerebro (2,3).

La capa intermedia de las meninges se conoce como aracnoides (2,3). Esta membrana está formada por células unidas entre sí mediante uniones estrechas (*gap junctions*, en inglés) que delimitan el espacio subaracnoideo (2,3). A través de este espacio fluye el líquido cefalorraquídeo, el cual protege las estructuras nerviosas frente a daños mecánicos (2,3). El espacio subaracnoideo presenta proyecciones hacia la piamadre denominadas trabéculas, así como vellosidades que participan en la reabsorción del líquido cefalorraquídeo hacia el torrente sanguíneo (2,3). Además, a través del mismo discurren las arterias más importantes que penetran en el cerebro (2,3).

Por último, la membrana más delgada que se encuentra adherida al parénquima del SNC se conoce como piamadre. Esta membrana está altamente vascularizada y su semipermeabilidad permite la circulación del líquido cefalorraquídeo a lo largo de los vasos penetrantes de los espacios perivasculares (2,3).

Dentro del parénquima del SNC, y localizada yuxtapuestamente a la piamadre, se encuentra la glía limitante, formada por la asociación de astrocitos y pies astrocíticos. Estas células ofrecen otro nivel de protección para el SNC ya que presentan una permeabilidad selectiva al paso de moléculas y patógenos hacia el mismo (2,3).

### 2.1.2. La BHE

La microvasculatura del SNC está provista de una estructura con propiedades únicas: la BHE (Figura 1) (4–8). Se trata de una barrera altamente selectiva que limita el intercambio de sustancias entre la sangre y el cerebro, manteniendo así la homeostasis del SNC y el correcto funcionamiento neuronal (4,6–8). Además, desempeña un papel crítico en la protección contra toxinas, patógenos, inflamación, daños y enfermedades que afectan al SNC (4,6,8). La disfunción de la BHE conlleva a desregulaciones en la homeostasis cerebral y a la invasión de células inmunes en el SNC, procesos que derivan en el

malfuncionamiento y degeneración neuronal (4,6,8). De este modo, se ha identificado la pérdida de estas propiedades exclusivas de la BHE en enfermedades neurológicas tales como el accidente cerebrovascular, la esclerosis múltiple o los traumatismos craneoencefálicos (TCEs), entre otros (4,6,9).

En cuanto a la composición de la BHE, destacan las células endoteliales, las cuales forman parte las paredes de los vasos sanguíneos. En el SNC, estas células presentan unas propiedades únicas que les permiten regular de manera altamente selectiva el intercambio de iones, moléculas y células entre la sangre y el cerebro (4,6–8).

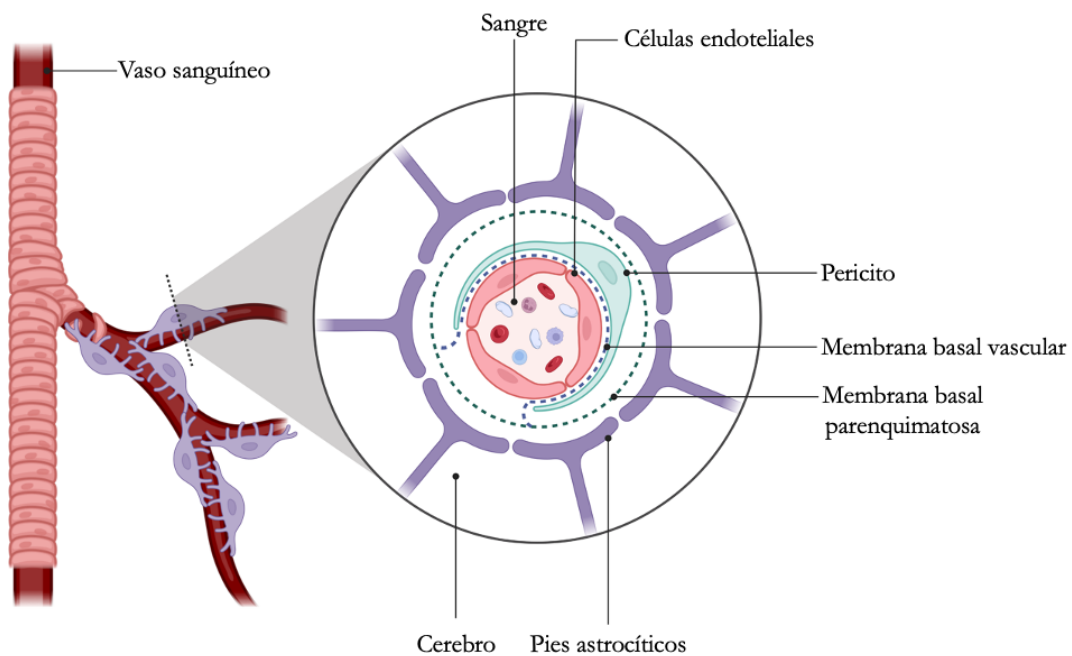
Otro elemento importante en la composición de la BHE son las células murales, células contráctiles localizadas rodeando los grandes vasos y los pericitos. Los pericitos son células situadas en la superficie abluminal del endotelio vascular que se encuentran embebidas en la membrana basal. Entre sus funciones destacan la regulación de la angiogénesis, la deposición de la matriz extracelular, la cicatrización de heridas, la regulación de la infiltración de células inmunes y del flujo sanguíneo, así como la formación de la BHE durante el desarrollo (4,7,8).

El vaso sanguíneo de la BHE está rodeado por dos membranas basales, una interna o vascular y una externa o parenquimatosa, también conocida como glía limitante perivascular. La membrana basal vascular está formada por la matriz extracelular secretada por las células endoteliales y los pericitos, mientras que la membrana parenquimatosa está constituida por las secreciones de los procesos astrocíticos. En general, los componentes de las membranas basales son el colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos y otras glicoproteínas, aunque existen ligeras idiosincrasias entre la composición de ambas membranas (4,7,8). La membrana basal ofrece una barrera adicional al paso de moléculas hacia el tejido neural y es esencial para el correcto funcionamiento nervioso. Así, la alteración de esta estructura por las metaloproteinasas de matriz (*MMPs*, por sus siglas en inglés) se ha relacionado con la infiltración leucocitaria observada en numerosas patologías nerviosas (4,7,8).

Del mismo modo, los astrocitos son un elemento esencial para el mantenimiento de la integridad de la BHE. Estas células sitúan sus procesos

entre las neuronas y los vasos sanguíneos, proporcionando elnexo celular entre ambos. Este acoplamiento neurovascular permite a los astrocitos regular el flujo sanguíneo en respuesta a la actividad neuronal, producir factores que modulen el funcionamiento endotelial durante el desarrollo y la adultez tales como moléculas relacionadas con la vía *Indian Hedgehog* (*Ihh*, por sus siglas en inglés), liberar factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*, por sus siglas en inglés), secretar factores neuroprotectores como el factor de crecimiento transformante beta (*TGFβ*, por sus siglas en inglés) y factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de la glía (*GDNF*, por sus siglas en inglés), así como liberar otro tipo de moléculas entre las cuales destacan el factor básico de crecimiento de fibroblastos (*bFGF*, por sus siglas en inglés) o agonistas de la vía *Wingless/Integrated* (*Wnt*), entre otros (4,6–8).

Por último, los macrófagos perivasculares actúan como primera línea de defensa inmunitaria fagocitando los residuos celulares (4,8). Por su parte, la microglía se relaciona con la regulación del desarrollo neuronal, con las respuestas inmunes innatas y adaptativas e intervienen en la cicatrización de heridas (4,7,8).



**Figura 1. Componentes de la BHE.** Esta figura fue creada utilizando imágenes de BioRender (BioRender.com).

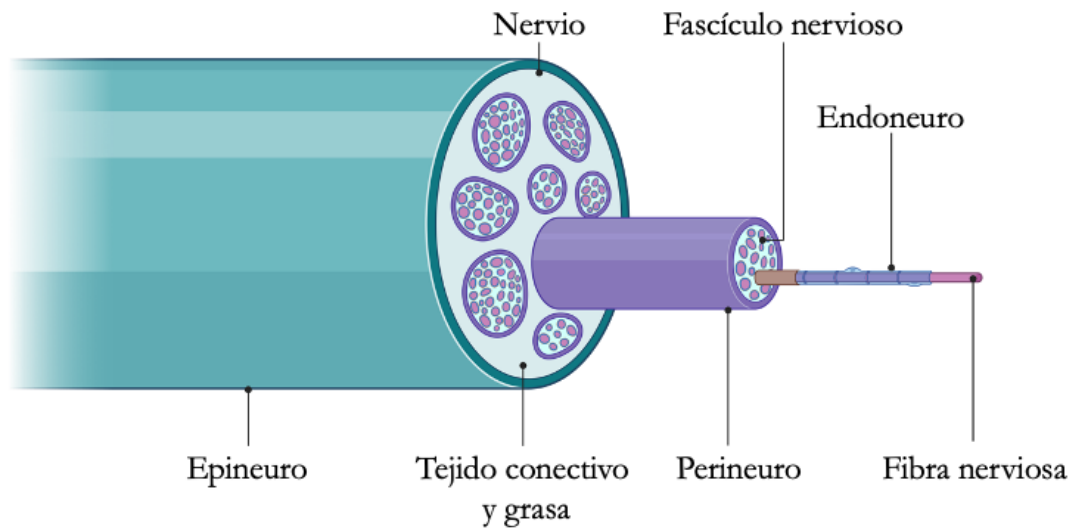
## 2.2. El SN Periférico

El SN Periférico (SNP) está constituido por los nervios que conectan el SNC con las estructuras periféricas (10,11). El SNP se puede dividir en somático, el cual procesa la información consciente procedente de los miembros superiores e inferiores, así como del tronco; y el autónomo o vegetativo, el cual se encarga de la regulación no consciente de órganos, vasos sanguíneos y glándulas (10,11). El SNP vegetativo se clasifica a su vez en SN simpático y parasimpático (10,11).

El SNP somático está compuesto por vías sensoriales aferentes y vías motoras eferentes que proyectan a los órganos efectores (10,11). Los cuerpos neuronales de las neuronas sensoriales se encuentran en el ganglio de la raíz dorsal, mientras que los nervios motores están compuestos por los axones de las neuronas motoras cuyos somas se localizan en el asta anterior de la médula espinal (10,12). Por lo tanto, cada nervio espinal está formado por la unión de dos raíces de la médula espinal (10). Asimismo, cada nervio raquídeo está formado por millones de fibras sensitivas y motoras, envueltas en una capa de tejido conectivo formando los fascículos nerviosos (1,12–14). A nivel estructural, en un nervio se diferencian las siguientes partes (Figura 2):

- Endoneuro: se trata de una vaina de tejido conjuntivo compuesta por colágeno tipo III y fibroblastos que recubre a las fibras nerviosas (1,12–14).
- Perineuro: vaina que recubre los fascículos nerviosos. Está formada por fibroblastos aplanados unidos entre sí mediante uniones estrechas formando la barrera hematonerviosa (BHN), controlando así la difusión de sustancias entre los fascículos de nervios periféricos (1,12–14).
- Epineuro: vaina que rodea el nervio en su totalidad. Está constituida por colágeno tipo I y fibroblastos (1,12–14).

Del mismo modo que ocurre en el SNC, el SNP está provisto de sistemas de protección específicos que garantizan el correcto intercambio de sustancias entre la sangre y los nervios periféricos (9,13,15). A esta barrera de protección, cuyo análogo sería la BHE en el SNC, se conoce como BHN (9,13,15).



**Figura 2. Estructura de un nervio periférico.** Esta figura fue creada utilizando imágenes de BioRender (BioRender.com).

### 2.2.1. La BHN

La BHN es una interfaz dual comprendida entre los capilares endoteliales del endoneuro y la multicapa celular que cubre el perineuro (13,16).

El compartimento endoneural está rodeado de axones mielinizados y no mielinizados, y es especialmente importante ya que supone la interfaz entre los axones, la mielina, y las células de Schwann de los nervios periféricos. Las paredes del compartimento endoneural están formadas por células endoteliales altamente unidas entre sí, lo que los sitúa como el primer regulador selectivo de la permeabilidad de la BHN y de transporte de solutos (13,15,16). Alteraciones en la permeabilidad de este compartimento se han relacionado con enfermedades desmielinizantes, dolor neuropático, neuropatías periféricas e inflamación neurogénica (13,15,16).

En relación con el compartimento perineural, éste se extiende desde las paredes capilares del perineuro hasta el endoneuro. Está formado por fibroblastos concéntricos dispuestos en varias capas y rodeando al endoneuro. Histológicamente, el perineuro está compuesto fundamentalmente por colágeno tipo I y III, lo que le atribuye propiedades de resistencia mecánica al nervio (13,15,16).

Se ha descrito que un daño mecánico en los nervios periféricos supone adaptaciones nerviosas y cambios en la permeabilidad de la BHN, neuroinflamación, proliferación de las células perineurales, y reclutamiento de mastocitos (16).

### 3. COMPOSICIÓN DEL SN

Desde un punto de vista celular, el SN está formado por dos tipos de células: las neuronas y las células de la glía (17).

#### 3.1. Las neuronas

Las neuronas constituyen la unidad básica estructural y funcional del SN. Estas células reciben información del entorno y de otras neuronas, procesan la información y la envían a otras neuronas u órganos efectores (1).

Morfológicamente, cada neurona consta de tres partes bien diferenciadas (1):

- Soma o cuerpo celular: se corresponde con el centro metabólico de la célula.
- Dendritas: ramificaciones localizadas próximas al cuerpo celular que reciben señales procedentes de las neuronas a través de las sinapsis.
- Axón: prolongación larga y única que parte del soma celular. Recibe la información procedente del soma para transmitirla a otra neurona u órgano efector (1).

##### 3.1.1. Tipos de neuronas

En función de las prolongaciones y la forma de su soma, las neuronas se clasifican en 3 grupos:

- Neuronas multipolares: son las más abundantes representando un porcentaje superior al 99% de las neuronas. Morfológicamente, los somas pueden presentar formas variables, el árbol dendrítico es amplio con la proyección de un único axón (1).

- Neuronas pseudounipolares: presentan un soma esférico concéntrico del cual parte una única prolongación que recorre una distancia corta para luego bifurcarse en una prolongación periférica y una central (1).
- Neuronas bipolares: células cuyo soma es circular u ovalado, con una prolongación en cada extremo del soma (1).

### 3.2. Las células gliales

El otro pilar fundamental del SN son las células gliales. Estas células desempeñan funciones indispensables para el funcionamiento del SN, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (17). Las células de la glía están implicadas en funciones tales como el transporte de nutrientes, la eliminación de productos de desecho, el mantenimiento electroquímico del entorno, la migración neuronal, el crecimiento y especificación del axón, la formación y eliminación de sinapsis, la comunicación neuronal y plasticidad, la regulación de la homeostasis, la función inmunológica, etc. (1,5,9).

#### 3.2.1. Tipos de células gliales

##### 3.2.1.1. La glía del SNC

- Astrocitos: son células derivadas del neuroectodermo (1,18). Representan el 20-40% de las células en el SNC de mamíferos (9,18). En general, se trata de células con amplias ramificaciones (1,17,18). Se distinguen dos tipos de astrocitos: los astrocitos de la sustancia gris denominados protoplasmáticos, y los de la sustancia blanca conocidos como astrocitos fibrosos (1,5,18). Unas estructuras astrocitarias de especial interés son los pies terminales, los cuales recubren la parte externa del encéfalo y médula espinal, así como los vasos sanguíneos del SNC, suponiendo la barrera entre el tejido nervioso y el exterior (1,5,9,17,18). Asimismo, la presencia de estas células es de vital importancia para el funcionamiento de las neuronas. Entre sus funciones destacan el soporte estructural, el mantenimiento de la homeostasis

cerebral, la liberación de factores de crecimiento, la secreción de citoquinas tales como la interleuquina 1 (*IL1*, por sus siglas en inglés), el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF $\alpha$* , por sus siglas en inglés) o las prostaglandinas, la selección de las sustancias que entran y salen al SNC ya que forman parte de la BHE, la eliminación de sustancias tóxicas, etc. (1,5,9,17,18).

- **Oligodendrocitos:** los oligodendrocitos son células derivadas del neuroectodermo que están presentes en la sustancia gris y blanca del encéfalo (1,5,17,18). Suponen aproximadamente el 25% de las células nerviosas (9,18). Tienen como principal función la mielinización, es decir, la creación de la vaina de mielina alrededor de los axones para incrementar la velocidad de propagación del potencial de acción a lo largo del mismo (1,5,17,18). Sin embargo, también llevan a cabo funciones relacionadas con el trofismo celular y la preservación axonal (5,18).
- **Microglía:** son células derivadas del mesodermo, y suponen el 5-10% de las células del SNC (1,5,9,17,18). La microglía es considerada como los macrófagos residentes del SNC, desempeñando de este modo el papel inmunitario del SNC (1,5,17,18). Además, se ha descrito su papel en el refinamiento sináptico, en la producción de factores tróficos neuronales y en el crecimiento del axón durante el desarrollo, así como en el incremento de la vascularización cerebral (18).

### 3.2.1.2. La glía del SNP

- **Células satélite:** son las células análogas a los astrocitos en el SNP. Estas células se encuentran rodeando los somas de las neuronas en ganglios sensitivos y vegetativos (1).
- **Células de Schwann:** son las células gliales más abundantes en el SNP y se localizan rodeando los axones de los nervios periféricos (1,5,17). Existen dos tipos de células de Schwann: las mielinizadas y las no mielinizadas (1,17). Las células de Schwann mielinizadas son las

equivalentes a los oligodendrocitos del SNC: se localizan rodeando los axones de los nervios periféricos y tienen funciones similares a los mismos (1,17). Por su parte, las células de Schwann no mielinizadas comparten semejanzas con los astrocitos en relación a sus funciones metabólicas y de soporte (17).

- Glía entérica: se localiza en los ganglios del SN autónomo de la microbiota intestinal (17). Se trata de células que comparten con los astrocitos algunas semejanzas en cuanto a su estructura y química (17).

## FISIOLOGÍA ÓSEA

### 1. EL HUESO

El hueso es un tejido rígido y dinámico que está en constante renovación (19–24). Representa una de las estructuras básicas del sistema músculo-esquelético y desempeña funciones cruciales como dar soporte al organismo, ser el punto de anclaje de los músculos, ofrece protección a órganos vitales como a la médula espinal o al cerebro, y constituye un importante reservorio de células hematopoyéticas y células madre mesenquimales (*MSCs*, por sus siglas en inglés), así como de iones de calcio y fosfato del organismo (19,22,23,25).

### 2. CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE HUESO

Existen diferentes formas de clasificar los huesos dependiendo del lugar donde se encuentran, su forma, su consistencia o su tamaño. La forma más frecuente utilizada en la literatura para su clasificación es la de los huesos planos y huesos largos (24).

Se engloban en la clasificación de huesos planos aquellos que forman el esqueleto cráneo-facial, así como las escápulas, el esternón y las costillas. Este tipo de huesos están formados principalmente por hueso esponjoso, también conocido como hueso trabecular, rodeados de una fina capa de hueso cortical (24).

En relación a los huesos largos, se incluyen en esta clasificación los huesos de las extremidades, así como los metacarpos, los metatarsos y las falanges (24). La estructura general de este tipo de huesos incluye un canal central conocido como médula ósea amarilla rodeado de endostio, tejido óseo y periostio. Los huesos largos están formados por hueso cortical y esponjoso. La diferencia entre estos tipos de huesos radica en tres aspectos: su porosidad, su estructura tridimensional, y su actividad metabólica (24).

El hueso cortical representa el 80% del peso del esqueleto de un adulto. Presenta una porosidad menor que el hueso esponjoso (5-10%), y es el principal

responsable de la función mecánica y protectora del hueso (19,24). La unidad fundamental del hueso cortical y responsable de su resistencia a las diferentes fuerzas es la osteona (24,25).

En relación al hueso esponjoso, éste representa el 20% del peso óseo de un adulto y presenta una mayor porosidad (50-90%) en relación con el hueso cortical. El hueso esponjoso tiene una alta tasa metabólica y de remodelado óseo, además de una amplia vascularización. Su principal función es absorber las cargas administradas al hueso así como permitir su deformidad (19,24).

El periostio es un componente óseo importante que cubre la superficie externa del hueso cortical que permite el anclaje de ligamentos y aporta vascularización adicional al hueso (24). Por su parte, el endostio es una estructura membranosa que recubre el interior del hueso. Este tejido presenta una rica vasculatura y células osteoprogenitoras que establecen comunicaciones directas con el espacio medular (24).

### **3. COMPOSICIÓN DEL HUESO**

El hueso se compone de un 10% de células y un 90% de matriz mineral, de la cual un 60% se corresponde con matriz mineral inorgánica, y un 30% con matriz mineral orgánica (19,22,24,25).

#### **3.1. Células**

##### **3.1.1. Osteoblastos**

Los osteoblastos son las principales células involucradas en la formación del hueso y desempeñan un papel fundamental en la síntesis de matriz ósea y en la mineralización del mismo. Estas células se originan a partir de las *MSCs* mediante un proceso denominado osteoblastogénesis (21,22,24,25).

Las *MSCs* son células pluripotentes que, bajo el estímulo apropiado, son capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares tales como fibroblastos, condrocitos, tenocitos, miocitos, osteoblastos o adipocitos (26–30).

Cabe destacar que los procesos de osteoblastogénesis y adipogénesis se encuentran en equilibrio y son antitéticos. Esta relación inversa indica que todo estímulo que promueve la formación ósea inhibe la adipogénica, y viceversa (26–30).

### 3.1.2. Osteocitos

Son las células más abundantes del tejido óseo. Se trata de osteoblastos maduros que se encuentran embebidos en la matriz mineral del hueso. Estas células presentan numerosas proyecciones que atraviesan el hueso y establecen contacto directo con los osteocitos adyacentes. Entre sus funciones destacan su capacidad para detectar estímulos mecánicos para iniciar el remodelado óseo, el mantenimiento de la matriz mineral y la mediación en la homeostasis del calcio (19–21,24,25).

### 3.1.3. Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas formadas por la fusión de varios progenitores mononucleares de la línea monocito/macrófago en un proceso conocido como osteoclastogénesis. Estas células presentan un borde en cepillo que les permite acidificar el medio para llevar a cabo su principal función: la resorción ósea (21,22,24,25).

### 3.1.4. Células de revestimiento óseo

Las células de revestimiento óseo son células residentes localizadas en la superficie del hueso pertenecientes a la línea osteoblástica. Estas células se comunican directamente con los osteocitos, formando una red extensa altamente sensitiva a lo largo de la matriz ósea. Gracias a estas conexiones, cambios en la superficie ósea tales como microfracturas, fracturas o traumatismos son detectados, produciéndose una respuesta adecuada por parte de las mismas para preservar la integridad del hueso (31).

## 3.2. Matriz ósea

### 3.2.1. Matriz orgánica

Entre los componentes de la matriz orgánica destacan el colágeno tipo I, proteína más abundante suponiendo el 88% de esta matriz (19,22,24,25). También presentes, pero en menor medida, están otras proteínas, las cuales representan el 10% de la matriz orgánica, y, en menor abundancia, los lípidos y glicosaminoglicanos, que solo suponen entre el 1-2% de la matriz orgánica del hueso (19,22,24).

### 3.2.2 Matriz inorgánica

La matriz inorgánica del hueso, también conocida como matriz mineral, está fundamentalmente compuesta por cristales de hidroxapatita y calcio, así como por algunos iones entre los que destacan el sodio, el flúor, y el magnesio (19,22,25).

Por lo tanto, la matriz ósea está fundamentalmente formada por una combinación de colágeno tipo I y cristales de hidroxapatita. Sin embargo, existen otras proteínas que forman parte de la matriz ósea como las proteínas morfogénicas óseas (*BMPs*, por sus siglas en inglés), los factores de crecimiento insulínico 1 y 2 (*IGFs*, por sus siglas en inglés), la sialoproteína y la osteopontina (*SPP1*, por sus siglas en inglés) (25).

## 4. EL PROCESO DE OSIFICACIÓN

Desde un punto de vista embriológico, el proceso de osificación puede originarse de diferentes maneras. Por una parte, las células de la cresta neural procedentes de los márgenes dorsales del tubo neural migran hacia la parte anterior del cráneo, dando lugar a la dentina de los dientes, y a los tejidos conectivos, huesos y cartílago de la parte anterior del cráneo. Por su parte, de las células del mesodermo derivan las estructuras cartilaginosas y óseas de la

parte posterior del cráneo, así como el esqueleto axial y apendicular del cuerpo humano (24–26,32).

El inicio de la esquelotogénesis comienza cuando las *MSCs* de estas zonas migran hacia los lugares donde tendrá lugar la formación ósea. Ahí se condensan, y continúan su diferenciación por uno de los dos procesos formadores de hueso: la osificación intramembranosa y la endocondral (26,32).

#### **4.1. Tipos de osificación**

##### 4.1.1. Osificación intramembranosa

Una vez iniciada la condensación de las *MSCs*, estas células pueden diferenciarse directamente a osteoblastos para formar el hueso. Este tipo de osificación se conoce como intramembranosa, y tiene lugar en la formación de la mayoría de los huesos planos (24–26,32,33).

##### 4.1.2. Osificación endocondral

La otra vía formadora de hueso es la osificación endocondral. En este tipo de osificación, el conglomerado de las *MSCs* pasa previamente por la formación de un molde cartilaginoso para crear la estructura ósea final. La osificación endocondral se produce mayoritariamente en la formación de huesos largos (24–26,32,33).

La osificación endocondral es indispensable para el desarrollo, crecimiento y reparación de huesos largos. La formación del molde cartilaginoso tiene lugar en los centros de osificación primarios, localizados en la diáfisis del hueso, y en los centros de osificación secundarios situados en las epífisis. Una vez que las *MSCs* se condensan en el lugar de formación de hueso, se produce la liberación de numerosos factores que median la diferenciación de las *MSCs*. Las células localizadas en el centro de la condensación de las *MSCs* darán lugar a los condrocitos, mientras que las células periféricas formarán el pericondrio. A continuación se produce la maduración de los condrocitos para finalmente culminar con la invasión de los vasos sanguíneos procedente de los tejidos

circundantes. En este punto, la mayoría de los condrocitos hipertróficos entran en apoptosis y el molde de cartílago sufre un proceso de remodelado para formar el hueso trabecular (26,32,34).

En la placa de crecimiento se diferencian las siguientes zonas:

- Zona de reposo: los condrocitos son pequeños, uniformes y presentan una tasa proliferativa baja. Estas células empiezan a producir colágenos de tipo I, II y V, así como componentes típicos del cartílago como colágenos tipo II, IX y XI (24,34).
- Zona proliferativa: es la zona subyacente a la zona de reposo. Los condrocitos se dividen, adquieren una forma aplanada y se posicionan formando columnas longitudinales. Las células empiezan a expresar colágeno VI, matrilina 1, así como colágenos II, IX, XI, y agrecano (34).
- Zona perihipertrófica: se trata de una zona de transición en la cual los condrocitos se preparan para la fase hipertrófica. Se caracteriza por la expresión de *Ihh* (24,34).
- Zona hipertrófica: se inicia la expresión de colágeno X y se reducen los niveles de producción de los colágenos II, IX y XI. Asimismo, se induce la expresión de la metaloproteinasa de matriz 13 (*MMP13*, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina (*ALP*, por sus siglas en inglés), *VEGF*, *SPP1*, y el factor de transcripción relacionado con RUNT tipo 2 (*RUNX2*, por sus siglas en inglés) (24,32,34).
- Zona de invasión: se produce la vascularización del cartílago y la formación del collar óseo. Los vasos sanguíneos procedentes del tejido circundante invaden el centro de la zona hipertrófica y el pericondrio, formando el collar óseo. De este modo, se establecen los centros de osificación primarios, localizados en la futura diáfisis de los huesos, a partir de los cuales se formará el hueso trabecular (24,26,32).
- Zona de calcificación: los condrocitos se calcifican, entran en apoptosis, se produce la migración de las células osteoprogenitoras y su diferenciación a osteoblastos para dar lugar a la formación de hueso (24).

El proceso de osificación endocondral está rigurosamente controlado por diferentes factores y hormonas entre los que destacan las *BMPs*, los factores de crecimiento de fibroblastos (*FGFs*, por sus siglas en inglés), las proteínas de la

familia *Wnt*, el *TGF $\beta$* , la hormona de crecimiento (*GH*, por sus siglas en inglés), los *IGFs*, y las *MMPs*, entre otros (26,32,34).

#### 4.1.3. Osificación en la consolidación de fracturas

Las fracturas son una de las lesiones más frecuentes que afectan al aparato locomotor. Una correcta consolidación de fracturas requiere de una adecuada alineación anatómica de las estructuras afectadas, así como de la estabilidad de las mismas (35). En el proceso de consolidación, ambos tipos de osificación coexisten (33,35). Se diferencian tres fases en el proceso de consolidación de fracturas:

- Fase inflamatoria: esta etapa se inicia como respuesta al daño tisular generado tras la fractura. Tras una fractura se produce una ruptura de vasos sanguíneos, así como un daño en las células y tejidos provocando un proceso inflamatorio con la consecuente extravasación de citoquinas e infiltración leucocitaria. Durante esta fase se produce el hematoma, el cual se caracteriza por ser una zona de hipoxia y bajo pH. Este ambiente promueve de forma temporal la invasión de células inflamatorias, las cuales secretan citoquinas como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (*MCP1* o *CCL2*, por sus siglas en inglés) o la interleuquina 6 (*IL6*, por sus siglas en inglés). Además, también se produce la secreción de otros mediadores inflamatorios tales como la interleuquina 1 beta (*IL1 $\beta$* , por sus siglas en inglés), el factor de necrosis tumoral (*TNF*, por sus siglas en inglés) o las *BMPs*.

Se ha descrito la necesidad de cierto grado de inflamación para una correcta consolidación de las fracturas. Sin embargo, una respuesta inflamatoria aguda exagerada, así como la presencia de una inflamación crónica conllevan a la ruptura del balance entre la formación y destrucción óseas a favor de la osteoclastogénesis, promoviendo la pérdida de masa ósea (35).



- Fase de reparación: durante esta etapa, ambos tipos de osificación coexisten para iniciar la formación de hueso que dará lugar a la consolidación de la fractura (33,35). Esta fase se inicia con la formación

de hueso mediante un proceso de osificación intramembranosa en el periostio, que conlleva a la formación del callo óseo. A continuación, el callo óseo crece y prolifera en dirección a la zona de fractura. En el caso de que exista compromiso vascular ligado a hipoxia, se favorece la proliferación de los condrocitos mediante un proceso de osificación endocondral. Posteriormente, los vasos sanguíneos invaden el callo cartilaginoso y las células de tipo osteoclasto resorben el cartílago calcificado. Finalmente, las *MSCs* se diferencian a osteoblastos para rellenar la laguna generada por los osteoclastos y permitir la formación de hueso *de novo* (33,35).

- Fase de remodelado: tras la creación de un puente óseo entre los fragmentos de la fractura, el diámetro del callo óseo se reduce gracias a la acción de los osteoclastos, los niveles de citoquinas y vascularización vuelven a un estado pre-fractura, y el hueso es remodelado (35).

## 5. EL METABOLISMO DEL HUESO

### 5.1. Modelado y remodelado óseos

A los procesos responsables de la regeneración ósea continua se le conocen como remodelado y modelado óseo. Un correcto modelado y remodelado óseos requiere de una regulación coordinada entre la formación y destrucción de hueso (19–22).

La diferencia entre ambos procesos radica en el momento y la localización en el que se llevan a cabo. En el caso del modelado óseo, éste se inicia en la etapa fetal y continúa hasta la maduración del esqueleto. Se trata de un proceso que tiene lugar simultáneamente en diferentes zonas anatómicas, y es el responsable del crecimiento, de la adquisición morfológica y masa ósea, así como de las adaptaciones mecánicas del hueso (20,21,36). Por su parte, el remodelado óseo persiste durante toda la adultez y se produce en zonas específicas del organismo para perpetuar la integridad del esqueleto y, normalmente, se encuentra

asociado a un proceso subyacente de mantenimiento o reparación tras un daño óseo (20,21,36).

El remodelado óseo es llevado cabo en las unidades de remodelado óseo, formadas principalmente por los osteoblastos, osteocitos, las células de revestimiento óseo y los osteoclastos (20,21). La liberación de diferentes hormonas y factores (Tabla 1) permiten la correcta regulación de este proceso, en el cual se diferencian seis fases (Figura 3):

- Fase de activación: los osteocitos detectan la señal de inicio del remodelado óseo, el cual puede ser por ejemplo un estímulo mecánico o un daño directo sobre el hueso, lo que provoca cambios en la homeostasis del tejido óseo. En condiciones basales, los osteocitos secretan *TGFβ*, el cual inhibe la osteoclastogénesis. Daños que provoquen la apoptosis de estas células suponen una reducción en los niveles de *TGFβ*, promoviendo así la formación de osteoclastos (19–21). Otra hormona implicada en esta fase del remodelado óseo es la hormona paratiroidea (*PTH*, por sus siglas en inglés). A nivel óseo, esta hormona se une a sus receptores en las células osteoblásticas activando una serie de rutas cuyo resultado final es la secreción de moléculas que provocan el reclutamiento de los precursores osteoclásticos, induciendo su activación y diferenciación, e iniciando la resorción ósea (19–22).
- Fase de resorción: los osteoblastos responden a las señales generadas por los osteocitos y reclutan a los osteoclastos, si bien estos también pueden ser directamente activados por los osteocitos, en el lugar en el que tendrá lugar el remodelado óseo. En respuesta a la liberación de la *PTH*, los osteoblastos producen *CCL2*, una quimiocina capaz de reclutar a los osteoclastos. Además, se produce un incremento en la liberación del ligando del factor nuclear kappa B (*RANKL*, por sus siglas en inglés) y del factor estimulante de colonias 1 (*MCSF*, por sus siglas en inglés), los cuales promueven la supervivencia y maduración de los precursores osteoclásticos. Al mismo tiempo, disminuyen los niveles de osteoprotegerina (*OPG*, por sus siglas en inglés), proteína con un papel anti-osteoclastogénico al ser capaz de secuestrar el *RANKL*, evitando su unión al receptor *RANK* (19–22).

Asimismo, los osteoblastos liberan *MMPs* en respuesta a estos estímulos, las cuales degradan el osteoide de la superficie ósea facilitando el anclaje del osteoclasto al mismo. Este acoplamiento se conoce como zona de sellado y representa el lugar dónde los osteoclastos liberan enzimas proteolíticas e hidrogeniones a través de su borde en cepillo, acidificando el medio y provocando la disolución de la matriz mineralizada formando las lagunas de *Howship*. La matriz ósea restante es degradada por enzimas colagenolíticas como la Catepsina K (19–22).

- Fase de cambio: tras la resorción ósea, las lagunas de *Howship* permanecen cubiertas por partículas de colágeno desmineralizado no digerido. La eliminación de estos restos lo llevan a cabo células mononucleares de origen incierto, que además preparan la superficie para la nueva formación de hueso. Durante esta fase se produce la desaparición de la mayoría de los osteoclastos (19–21).

- Fase de formación: en este estadio se produce el reemplazo de los osteoclastos por los osteoblastos. La secreción de la *PTH* inhibe la liberación de esclerostina (*SOST*, por sus siglas en inglés), la cual es un inhibidor de la vía *Wnt*, la principal vía involucrada en el anabolismo del hueso, promoviendo de este modo la formación de hueso (19–21).

Una vez que las *MSCs* o precursores osteoblásticos alcanzan la laguna de reabsorción, éstas se diferencian y secretan moléculas para dar lugar a la formación ósea. Entre las moléculas secretadas destacan el colágeno tipo I, principal componente orgánico del hueso, proteoglicanos, proteínas glicosiladas como la *ALP*, lípidos, etc. Finalmente, se produce el depósito de hidroxiapatita en el nuevo osteoide (19–21).

- Fase terminal: tras la mineralización, los osteoblastos se embeben en la matriz mineralizada, entran en apoptosis, y se diferencian a osteocitos (19,20). Los osteocitos expresan *SOST*, reduciendo así la actividad ósea remodeladora (21).
- Fase de quiescencia: las células de revestimiento óseo se disponen en la superficie del hueso. Las células B presentes en la médula ósea secretan *OPG*, la cual protege el hueso y suprime la osteoclastogénesis (20,21).

Esta fase se mantendrá hasta que un nuevo estímulo desencadene un nuevo ciclo de remodelado óseo

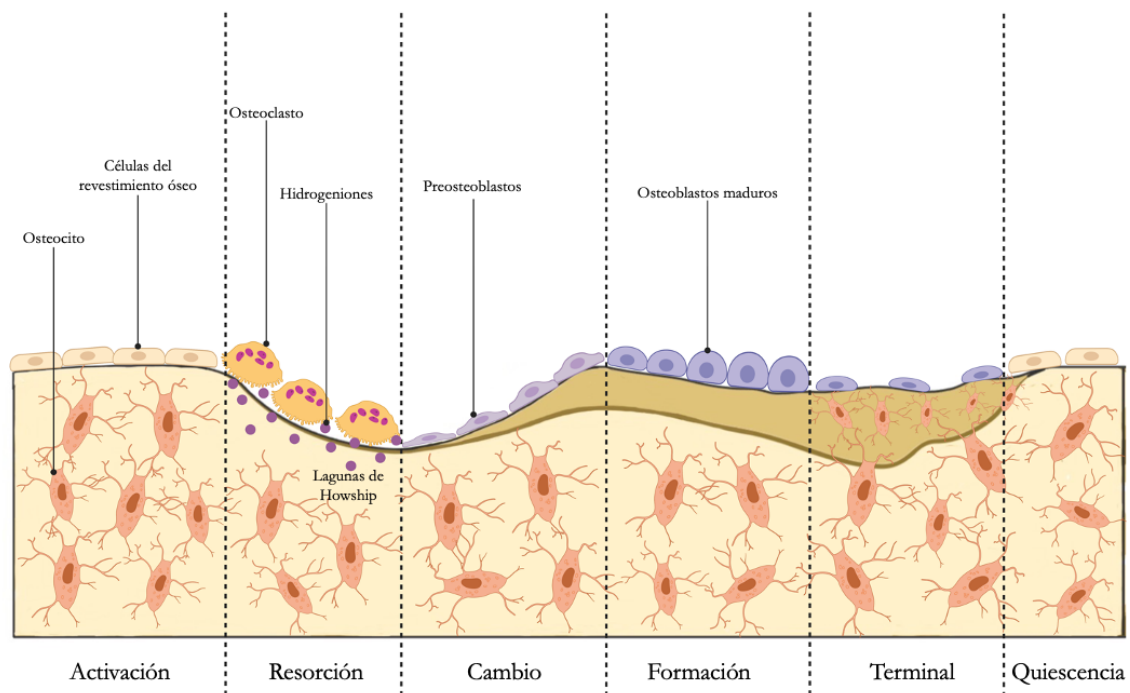
**Tabla 1. Hormonas y factores reguladores del remodelado óseo.**

Fases del remodelado óseo	Hormonas y factores reguladores del remodelado óseo
Fase de activación	<p>↑ <i>PTH, IGF-1, IL1, IL6, PGE<sub>2</sub>, Calcitriol, TNF<math>\alpha</math></i></p> <p>↓ <i>Estrógenos, TGF<math>\beta</math></i></p>
Fase de resorción	<p>↑ <i>RANKL, MCSF, IL1<math>\beta</math>, IL1<math>\alpha</math>, TNF<math>\alpha</math>, ácido retinoico, S1P, MMPs</i></p> <p>↓ <i>OPG, GM-CSF, estrógenos, calcitonina, IL4, IL18, TGF<math>\beta</math></i></p>
Fase de cambio	↑ <i>TGF<math>\beta</math>, IGF-1, IGF-2, BMPs, PDGF, FGF</i>
Fase de formación	<p><i>WNTs, BMPs, IGF-1, FGF-2, FGF-18, PDGFs,</i></p> <p>↑ <i>PTH, 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D<sub>3</sub>, RUNX2, TGF<math>\beta</math>, CT-1, efrina B2</i></p> <p>↓ <i>PDGFs, glucocorticoides, leptina, pirofosfato Sema4D, SOST</i></p>
Fase terminal	↑ <i>SOST</i>
Fase de quiescencia	↑ <i>OPG</i>

*PTH* – paratohormona, *IGF-1* – factor de crecimiento insulínico 1, *IL1* – Interleuquina 1, *IL6* – Interleuquina 6, *PGE<sub>2</sub>* – prostaglandina E<sub>2</sub>, *TNF $\alpha$*  – factor de necrosis tumoral alfa, *TGF $\beta$*  – factor de crecimiento transformante beta, *RANKL* – ligando del factor nuclear kappa beta, *MCSF* – factor estimulante de colonias 1, *IL1 $\beta$*  – interleuquina 1 beta, *IL1 $\alpha$*  – interleuquina 1 alfa, *TNF $\alpha$*  – factor de necrosis tumoral alfa, *S1P* – esfingosina 1-fosfato, *MMPs* – metaloproteinasas, *OPG* – osteoprotegerina, *GM-CSF* – factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, *IL4* – interleuquina 4, *IL18* – interleuquina 18, *IGF-2* – factor de crecimiento insulínico 2, *BMPs* – proteínas morfogénicas óseas, *PDGF* – factor de crecimiento derivado de plaquetas, *FGF* – factor de crecimiento fibroblástico, *Wnts* – moléculas de la vía *Wnt*, *FGF-2* – factor de crecimiento fibroblástico 2, *FGF-18* – factor de crecimiento fibroblástico 18, *RUNX2* – factor de transcripción relacionado con RUNT tipo 2, *CT-1* – cardiotrofina, *Sema4D* – semaforina 4D, *SOST* – esclerostina (19,21,22).

Las alteraciones en el remodelado óseo, tanto al alza como a la baja, derivan en la aparición de patologías (19,21,22,25). Así, entre las enfermedades desencadenadas por una disminución de la masa ósea destacan la osteoporosis,

la osteopenia, el raquitismo o la fragilidad ósea (19,21,22,25). Por otro lado, existen alteraciones provocadas por una excesiva masa ósea, las cuales pueden ser debidas a un incremento del remodelado óseo, como sucede en la esclerostosis, a una resorción ósea reducida, como es el caso de la osteopetrosis, o a una alteración entre el proceso de formación y resorción óseas, como sucede en la enfermedad de Paget (19,22,25,36,37). Sin embargo, hay enfermedades como la osificación heterotópica (OH) dónde se produce un crecimiento anómalo del hueso, cuyo origen y mecanismo permanecen desconocidos.



**Figura 3. Fases del remodelado óseo.** Esta figura fue creada utilizando imágenes de BioRender (BioRender.com) y SMART Servier Medical Art (smart.servier.com).

### 5.1.1. La vía *Wnt*

La vía *Wnt* es una ruta de señalización celular que está constituida por diferentes proteínas celulares secretadas, cruciales para un correcto remodelado óseo. En concreto, esta vía actúa sobre los osteoblastos, desempeñando un papel importante en la formación ósea (37–39).

Las proteínas de la vía *Wnt*, al unirse con su receptor, desencadenan una serie de señales intracelulares que interactúan con otros factores, como las *BMPs*, promoviendo la osteoblastogénesis. Dependiendo del tipo de unión establecida

entre el ligando y el receptor, se pueden activar tres vías diferentes: la vía canónica, la del calcio, y la no canónica. La vía canónica es la más conocida y la que está principalmente involucrada en el proceso de formación ósea. Esta vía depende de la estabilidad de la beta-catenina presente en el citoplasma de los osteoblastos. En ausencia de ligandos de la vía *Wnt*, la beta-catenina es fosforilada principalmente por la glucógeno-sintasa-quinasa 3 beta (*GSK3β*, por sus siglas en inglés) y degradada. La unión de las proteínas *Wnt* a su receptor provoca la inhibición de *GSK3β*, impidiendo la degradación de la beta catenina y promoviendo la acumulación de la misma en el citoplasma del osteoblasto. Posteriormente, la beta catenina es transportada al núcleo, dónde se asocia con factores de transcripción para regular los genes de la vía *Wnt*, promoviendo la diferenciación de las *MSCs* a osteoblastos (36–39).

Existen ligandos competitivos capaces de inhibir la actividad de la vía *Wnt*. Entre ellos destacan *SOST* y la proteína *Dickkopf 1* (*DKK1*, por sus siglas en inglés) (36–39).

Adicionalmente, se ha descrito otro papel de la vía *Wnt* en la promoción de la formación ósea a través de su capacidad para bloquear la adipogénesis. La activación de la vía *Wnt* es capaz de inhibir factores de transcripción adipogénica como la proteína de unión al potenciador CCAAT (*CEBP*, por sus siglas en inglés) o el receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma (*PPARG*, por sus siglas en inglés) (27,30,36,37).

## PATOLOGÍA DEL HUESO Y DEL SN: LA OH

### 1. LA OH

La OH es, por definición, la formación de hueso laminar maduro mediante procesos de osificación endocondral y/o intramembranosa en tejidos blandos extra-esqueléticos como la piel, el tejido subcutáneo, el músculo esquelético, el tejido fibroso, las paredes de los vasos sanguíneos y los ligamentos (40–44). Esta patología fue descrita por primera vez por Reindel en 1883 y, posteriormente, Dejerne y Ceillier reportaron su elevada incidencia en los soldados heridos por explosiones durante la I Guerra Mundial (40,41,44,45).

Entre los factores de riesgo de la OH destacan el sexo masculino (ratio 3:2), haber sufrido un TCE o una lesión medular, quemaduras, fracturas, cirugía de reemplazo articular de cadera, procesos infecciosos, la necesidad de ventilación mecánica y períodos de inmovilización prolongados. La prevalencia de esta enfermedad depende del mecanismo lesional (Tabla 2), del tiempo de inmovilización, del porcentaje de área afectada y del grado de espasticidad muscular (40,43,46).

**Tabla 2. Prevalencia de la OH en relación con el mecanismo lesional (40,46).**

<b>Prevalencia de la osificación heterotópica</b>	
Mecanismo lesional	Tasa de osificación heterotópica (%)
Quemaduras	0,2 – 4
Fracturas	40
Reemplazo articular de cadera	3 – 90
TCE	> 50
Lesión medular	20
Otras alteraciones del SNC	10 – 53

Clínicamente, los signos y síntomas clínicos de la OH se pueden presentar tempranamente en la tercera semana post-incidente, o de forma tardía a partir de las doce semanas (41,47). Actualmente, no existe un signo patognomónico

que permita establecer el diagnóstico temprano de esta enfermedad. Su diagnóstico se basa en la recopilación de hallazgos clínicos no específicos de la patología entre los cuales destacan el referimiento de dolor por parte del paciente, así como la presencia de signos como fiebre, tumefacción, eritema, deformidad ósea y una restricción en el rango de movimiento articular que se desencadena *a posteriori* del mecanismo lesional, acompañado de limitación funcional (40,41,43,47). A pesar de que cualquier estructura podría ser susceptible de desarrollar este tipo de masas óseas ectópicas, existen regiones anatómicas predisponentes, las cuales varían en función de la alteración que lo desencadena. Así, en aquellos pacientes que sufrieron una lesión medular o un TCE, el hueso ectópico aparece, por orden de prevalencia en la cadera, rodilla, codo y hombro. En el caso de los quemados, el codo se afecta en primera instancia, seguido del hombro y finalmente de la cadera. En relación con los reemplazos articulares, la presencia de masas óseas ectópicas se observa con mayor frecuencia tras una cirugía de reemplazo de cadera (40,43).

Entre las complicaciones asociadas a esta patología destacan la anquilosis, el atrapamiento nervioso y vascular, el dolor crónico intratable, las úlceras por presión o las complicaciones respiratorias en caso de verse afectados los músculos respiratorios (41,44,48).

Como herramienta complementaria a los síntomas y signos clínicos, los estudios radiológicos son imprescindibles para determinar la localización exacta y la extensión de la masa ósea. Este tipo de técnicas son cruciales para establecer un diagnóstico diferencial con otras patologías como el osteosarcoma, osteocondroma, calcificaciones o procesos metastásicos (40,41,47).

Paralelamente, los estudios serológicos y los uroanálisis pueden ayudar a esclarecer el diagnóstico de la OH. Así, se han descrito como marcadores útiles para el diagnóstico de esta enfermedad los niveles de *ALP* en sangre y los niveles de prostaglandina  $E_2$  en orina. Su uso está recomendado debido a su baja invasividad y coste. Sin embargo, se trata de parámetros que pueden dar lugar a confusión ya que la normalización de los mismos no siempre se corresponde con la maduración ósea. Por lo tanto, no es posible establecer un diagnóstico final de esta patología en base a los mismos (41,42,46–48).

## 1.1. Fisiopatología de la OH

Se ha descrito que, para la formación del hueso ectópico, es necesaria la presencia de tres factores: un factor desencadenante, un reservorio de células capaces de diferenciarse a osteoblasto y, por último, un ambiente pro-osteoblastogénico (42).

### 1.1.1. El factor desencadenante

Actualmente, la OH se considera una complicación derivada de una alteración genética o de un proceso traumático que lo desencadene (Tabla 2) (40–42,47). A pesar de que se desconoce el origen de la señal que promueve la migración de los componentes involucrados en la formación ósea hacia el lugar de formación del hueso ectópico, se cree que alguna proteína secretada por las células del lugar de lesión podría ser la responsable de este efecto (40–42).

### 1.1.2. La existencia de precursores osteoblásticos

La formación de hueso ectópico es el resultado de un reclutamiento patológico de células precursoras con potencial osteoblástico. En este sentido, cualquier nicho de *MSCs* que no hayan alcanzado su destino celular desempeña un papel principal en el desarrollo de esta patología (40–42,47). Además, se ha sugerido que las células vasculares endoteliales y las células musculares satélites y tendinosas residentes podrían estar involucradas en el inicio de esta patología (40,44,47,49). Asimismo, se ha descrito la presencia de células precursoras osteoblásticas que también podrían contribuir en la aparición y formación de la OH (50,51).

### 1.1.3. La presencia de un ambiente promotor de la osteoblastogénesis

Para que la formación de hueso tenga lugar, es fundamental la presencia de un ambiente local que promueva la osteoblastogénesis. Tal y como se ha

mencionado previamente, la inflamación desempeña un papel esencial en el proceso de formación ósea y consolidación de fracturas (35). En relación con esto, se ha descrito que los tejidos donde se desarrolla la OH presentan una respuesta inflamatoria más intensificada o prolongada en respuesta al daño tisular, lo cual podría exacerbar el proceso de osificación fisiológico (40). Además, se han identificado potenciales factores involucrados en esta patología, entre los cuales destacan las *BMPs*. En concreto, *BMP2* y *BMP4* parecen estar altamente relacionadas con la OH debido a sus propiedades osteoinductivas (40–44,47,52). Sin embargo, no se han encontrado pruebas concluyentes que apoyen la asociación directa entre estos factores y la formación ósea ectópica.

Asimismo, también se han relacionado la modulación de los receptores retinoicos con el desarrollo de la OH. La inhibición de estos receptores activan la condrogénesis y, de este modo, la formación de hueso ectópico formado a través del proceso de osificación endocondral (40,43,52).

Otra de las vías involucradas en la formación de hueso ectópico es la de la diana de rapamicina en células de mamífero (*mTOR*, por sus siglas en inglés). Esta vía interviene en numerosos procesos celulares, incluyendo la diferenciación condrogénica. Se ha descrito un aumento de *mTOR* en pacientes con OH (43,52,53).

Finalmente, se han relacionado los factores inducibles por la hipoxia (*HIF*, por sus siglas en inglés) con la OH. Tras un episodio traumático, se produce un cambio en el ambiente que promueve la formación ósea. Así, bajo situaciones de hipoxia generadas por el mismo mecanismo lesional, se activa *HIF-1 $\alpha$* , un regulador de la respuesta celular a la isquemia. La traslocación de este factor al núcleo debido a la baja concentración de oxígeno favorece la liberación de citoquinas angiogénicas necesarias para la motilidad, reclutamiento y proliferación de las células endoteliales. Entre estos factores destacan el *VEGF*, el *bFGF*, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF*, por sus siglas en inglés) y la angiopoyetina-2. Además, *HIF-1 $\alpha$*  regula al alza la expresión del factor de transcripción de la región determinante del sexo Y-box-9 (*SOX9*, por sus siglas en inglés), indispensable para la osificación endocondral, así como la expresión de *BMP2* (40,43,44,52,53).

Otro de los cambios inducidos por la hipoxia asociada a un daño nervioso es la presencia de adipocitos pardos en la zona de la OH. Se ha descrito que estas células son capaces de reducir los niveles de oxígeno, así como de expresar factores angiogénicos que favorezcan la rápida vascularización del tejido, promoviendo de este modo el proceso de OH (54–56).

## **1.2. Etapas en la formación del hueso ectópico**

Atendiendo al grado de maduración del hueso, análisis histológicos y técnicas de imagen, se diferencian tres etapas en la formación de hueso ectópico.

La primera de ellas se caracteriza por la presencia de hueso inmaduro formado principalmente por matriz de colágeno dispuesta en función a las líneas de tensión y calcificaciones difusas. Este estadio no es posible visualizarlo mediante una radiografía convencional. Técnicas de imagen más avanzadas como la resonancia magnética serían necesarias para poder identificar estos hallazgos.

La segunda fase en la formación de hueso ectópico se caracteriza por una intensa inflamación, vascularización y calcificación. En esta etapa sería posible observar la osificación de las estructuras peri-articulares mediante radiografías.

Finalmente, la última etapa se corresponde con la maduración del hueso, presentando unas características histológicas y radiológicas similares al de un hueso normal (48,57).

## **2. CLASIFICACIÓN DE LA OH**

### **2.1. Clasificación de la OH según la extensión y localización de la masa ósea**

Actualmente existen diferentes escalas para clasificar la OH atendiendo a la extensión de la masa ósea y la localización de la misma. Entre ellas destacan la escala de Brooker para la cadera y la de Hastings y Graham para el codo (Tablas 3 y 4) (40,43,47).

**Tabla 3. Clasificación de la OH de cadera según Brooker (40,43,47).**

<b>Clasificación de la OH de cadera</b>	
Tipo	Definición
I	Islotes de hueso dentro de tejidos blandos
II	Osificación que se proyecta desde la pelvis o el fémur proximal por lo menos a 1 cm de distancia entre las superficies óseas opuestas
III	Osificación que se proyecta desde la pelvis o el fémur proximal con menos de 1 cm de distancia entre las superficies óseas opuestas
IV	Osificación que hace un puente completo entre el fémur proximal y la pelvis (anquilosis ósea)

**Tabla 4. Clasificación de la OH de codo según Hastings y Graham (40,43).**

<b>Clasificación de la OH de codo</b>	
Tipo	Definición
I	Evidencia radiográfica sin déficit funcional
IIA	Evidencia radiográfica con limitación en la flexo-extensión
IIB	Evidencia radiográfica con limitación en la prono-supinación
IIIA	Formación del hueso ectópico con anquilosis en la flexo-extensión
IIIB	Formación del hueso ectópico con anquilosis en la prono-supinación
IIIC	Formación del hueso ectópico con anquilosis en la flexo-extensión y prono-supinación

## 2.2. Clasificación de la OH según su etiología

### 2.2.1. OH congénita

Existen dos tipos de OH hereditaria descritos: la fibrodisplasia osificante progresiva (FOP) y la heteroplasia ósea progresiva (HOP) (41–44,58). Estas patologías raras son consideradas como las formas más graves de OH (41,42). En la FOP, la formación de hueso se inicia en las estructuras periarticulares, mientras que en la HOP comienza a nivel dérmico y del tejido subcutáneo

(42,43,58). Otra de las diferencias entre estas patologías radica en el tipo de osificación que tiene lugar para la formación del hueso. En la FOP, la osificación endocondral es la predominante, mientras que en la HOP es la intramembranosa. Además, en la FOP se distinguen malformaciones esqueléticas características como el acortamiento de los pulgares y dedos gordos de los miembros inferiores, sordera y alopecia. Otra de las características exclusivas de la FOP es que traumatismos y procesos quirúrgicos actúan como factores desencadenantes en la formación de nuevas placas óseas (41–43,47).

### 2.2.2. OH adquirida

Se trata de la modalidad de presentación de la OH más frecuente (41,43). En este tipo de OH coexisten ambos procesos de osificación, la endocondral y la intramembranosa (44), aunque algunos estudios apuntan a un predominio de la osificación endocondral (44,53,57). Entre las causas que subyacen la aparición de este tipo de OH destacan:

- OH adquirida de origen traumático:
  - Desencadenada tras procesos ortopédicos: la formación de hueso ectópico se produce tras cirugías de reemplazo articular, fijaciones, etc. (41,47).
  - Desencadenada tras procesos traumáticos: normalmente los procesos desencadenantes de la formación del hueso ectópico son traumatismos de alto impacto como fracturas, asociadas o no a quemaduras (41,47).
- OH adquirida de origen neurogénico o neurogénica (OHN): las causas que conllevan al crecimiento heterotópico del hueso son lesiones asociadas al SN (41,42,47).

#### 2.2.2.1. La OHN

La OHN es una de las complicaciones más frecuentes resultantes de una lesión del SNC. Este tipo de OH se desarrolla normalmente tras un politraumatismo en el cual estructuras centrales y periféricas están involucradas,

como sucede en el caso de un TCE asociado a fracturas óseas concomitantes, o en una lesión medular (Tabla 2) (40,43,46,57).

Actualmente no se han esclarecido los factores de riesgo para desarrollar OHN. Algunos estudios apuntan al sexo masculino y la edad comprendida entre veinte y treinta años como factores predisponentes para la aparición de esta patología. Sin embargo, cabe destacar que estas correlaciones podrían estar sesgadas debido al predominio de la incidencia de los TCEs y lesionados medulares entre este tipo de población. Curiosamente, la prevalencia de este tipo de OH es mucho menor entre la población pediátrica (48,49,52,57).

En cuanto a su etiopatogenia, ésta permanece desconocida a día de hoy. Una de las plausibles hipótesis avalada por la comunidad científica se basa en un posible efecto aditivo de los factores humorales neuroinmunológicos, que alcanzan las estructuras periféricas debido a una alteración en la permeabilidad de la BHE producida por el TCE, y de los factores locales liberados tras el traumatismo (59,60). Así, un aumento en la permeabilidad de la BHE podría favorecer la liberación de factores osteogénicos al torrente sanguíneo y activar la células progenitoras periféricas (61). Esto explicaría en parte la elevada prevalencia de esta patología ante la coexistencia de una lesión del SNC y una fractura, frente a la lesión nerviosa o la fractura de forma aisladas.

Por una parte, algunos estudios señalan la presencia de precursores osteoblásticos en el torrente sanguíneo como posibles contribuyentes en el desarrollo de la OH. Es bien sabido que existen precursores osteoclasticos y osteoblásticos en la circulación sanguínea periférica, encontrándose estos últimos en menor medida. Además, se ha descrito la presencia de células circulantes en sangre procedentes de la médula ósea con capacidad osteoformadora (50,51,56). Interesantemente, estas células se encuentran aumentadas durante el pico de crecimiento y tras una fractura ósea (50,51). Además, se ha determinado su capacidad migratoria hacia al torrente sanguíneo y de extravasación al lugar de formación de la OH (53,56).

Por otra parte, modelos animales de lesión medular han puesto de manifiesto el incremento humoral de factores relacionados con el remodelado óseo e inflamación, así como un aumento de la actividad osteoblástica. Acorde con esto, estudios científicos identificaron alteraciones en el suero y líquido

cefalorraquídeo de pacientes que sufrieron un TCE o una lesión medular, susceptibles de aumentar el metabolismo óseo (48,49,61–64). Entre los factores hallados destacan el incremento de los niveles circulantes de *TGFβ*, *IGF-2*, *PDGF*, *RUNX2*, *IL1*, *IL6* o *CCL2*, entre otros (48,49,64,65). Además, se evidenció un aumento en los niveles séricos de *ALP* en los pacientes tras sufrir una lesión medular, la cual estaba más incrementada en aquellos que desarrollaron OH tras la lesión (48,49,62). Asimismo, se ha descrito que los pacientes que sufrieron un TCE asociado a una fractura de hueso largo (FHL) duplican la velocidad de consolidación ósea, y presentan una hipertrofia del callo óseo superior al 50% en comparación a una consolidación normal (48,60,63,65). Todos estos hallazgos apuntan a un papel importante del SNC sobre el metabolismo óseo, y, por ende, su posible implicación con la formación de hueso ectópico.

Paralelamente al efecto de las lesiones del SNC sobre el hueso, se ha sugerido un papel importante de los nervios en la formación de hueso ectópico. Sin embargo, la relación entre el SNP y hueso no está completamente esclarecida.

El hueso es una estructura altamente inervada. Estudios han evidenciado la intrínseca relación existente entre la función nerviosa y el crecimiento del hueso. En concreto, estudios realizados en modelos animales demostraron el efecto de los nervios periféricos sobre el hueso, observándose una pérdida de masa ósea tanto del hueso cortical como trabecular tras la denervación (66,67). Asimismo, también se determinó el efecto de la afectación nerviosa sobre la consolidación de fracturas, objetivándose un incremento tanto en la velocidad de consolidación como en la cantidad de callo óseo formado en aquellos animales que sufrieron la lesión en el SNP (68).

En este sentido, un componente crítico para el desarrollo de la OHN es la integridad de la BHN. Ante un traumatismo, como por ejemplo una fractura ósea, el nervio puede sufrir alteraciones debido a estiramientos, fuerzas de compresión, o lesiones que pueden alterar la permeabilidad de la BHN. Se ha observado que mecanismos de estiramientos nerviosos repetitivos pueden dar lugar a la formación de neuomas. De hecho, la OH a menudo se acompaña de neuomas y schwannomas (55,69). Además, la activación de las vías aferentes sensoriales debido a un estímulo nocivo de carácter mecánico, térmico o

químico favorece la apertura de esta barrera. Como respuesta a estos estímulos, se inicia el proceso de neuroinflamación, con la consecuente liberación de neurotransmisores como el glutamato, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*CGRP*, por sus siglas en inglés), la sustancia P o las catecolaminas. La liberación de estos neurotransmisores por las terminaciones nerviosas ejercen un efecto directo sobre el metabolismo óseo, aumentando su actividad osteoblástica y reduciendo la osteoclástica (16,48,52,54,55,57,60).

Más recientemente, ciertos estudios han sugerido el origen de los progenitores osteoblásticos a nivel del endoneuro, tras demostrar que las células de este compartimento son capaces de expresar factores osteogénicos, como osterix, en presencia de *BMP2*. Además, se ha observado que, tras un traumatismo del nervio, estas células permanecen en el endoneuro solo durante veinticuatro horas, período tras el cual desaparecen del nervio, son detectables en el torrente sanguíneo y, posteriormente, en el lugar dónde tendrá lugar la formación de hueso ectópico (56,70,71). Interesantemente, estas células también han sido localizadas en el cartílago y el tejido adiposo pardo, sugiriendo la multipotencialidad de las mismas (70).

Finalmente, en el caso de los lesionados medulares, existe una pérdida de la función nerviosa motora y sensitiva en los niveles subyacentes a la lesión. Sin embargo, a pesar de no existir comunicación entre SNP y SNC, los nervios distales permanecen funcionales, aunque normalmente asociados a una hiperactividad anómala (54), lo que podría estar relacionado con la alta prevalencia de la OH en este tipo de pacientes.

### **3. ABORDAJE TERAPÉUTICO DE LA OH**

#### **3.1. Profiláctico**

##### **3.1.1. Antiinflamatorios no esteroideos**

Se ha descrito el uso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como la indometacina, para prevenir la aparición de la OH. Estos fármacos tienen la capacidad de inhibir la diferenciación de los precursores osteoblásticos. Sin

embargo, debido al efecto represor de la osteoblastogénesis, su uso debe ser minuciosamente controlado puesto que podrían producir un retraso en la consolidación de fracturas o el fracaso en la unión de las mismas (40,41,43,44,46–48).

### 3.1.2. Bifosfonatos

Los bifosfonatos inducen la apoptosis de los osteoclastos e inhiben la mineralización de manera indirecta. Por lo tanto, desempeñan un papel importante inhibiendo la resorción ósea. Sin embargo, su recomendación como profiláctico ante la OH resulta controvertido debido a su baja efectividad (40,43,44,46,48).

### 3.1.3. Radioterapia

El uso de la radioterapia resulta efectivo para la prevención de la OH de cadera, reduciéndose en un 25% su aparición. Sin embargo, el empleo de rayos X como profiláctico no se ha estudiado adecuadamente en otras articulaciones (40,41,43,44,46,47).

Estudios han demostrado una efectividad similar en el uso de AINEs y radioterapia para prevenir la OH. Su elección dependerá de las circunstancias específicas de cada paciente. Por ejemplo, en los pacientes quemados es preferible el uso de AINEs debido al efecto adverso de la radioterapia en generar contracturas en el tejido blando (40,43,47).

Sin embargo, este tipo de terapia no está exenta de efectos secundarios. Entre ellos destacan el retraso en la cicatrización, la no unión de los fragmentos óseos, la hemorragia y la recidiva de las masas óseas (40,41).

### 3.1.4. Otras terapias

Actualmente se están testando otros fármacos para prevenir la formación heterotópica de hueso. Entre ellos destacan los inhibidores de las *BMPs*, los

agonistas del ácido retinoico, los inhibidores de *HIF-1 $\alpha$*  o la inmunoterapia (49,52,53,57).

## 3.2. Tratamiento

### 3.2.1. Fisioterapia

El tratamiento fisioterápico en pacientes con OH resulta controvertido. Algunos estudios contraindican la manipulación pasiva temprana de estos pacientes debido a la posibilidad de generar microtraumas en la ejecución de movimientos, o por las posturas forzadas que podrían exacerbar la aparición de hueso ectópico. Sin embargo, otros indican que su uso puede resultar beneficioso para este tipo de pacientes de forma temprana, así como una vez que la masa ósea ya esté establecida. En concreto, la evidencia científica avala el uso de técnicas pasivo-asistidas no forzadas y activas dentro del rango de movimiento no doloroso. A pesar de no existir un consenso, este tipo de terapia podría resultar ventajosa en aquellos pacientes que presenten espasticidad y que tengan un rango de movimiento limitado que afecte a la realización de tareas de la vida diaria (40,41,43,44,48,72–75).

### 3.2.2. Fármacos

A pesar de los fármacos disponibles para el manejo profiláctico de la OH, actualmente no existe ningún consenso acerca de qué tratamientos podrían resultar efectivos para tratar esta enfermedad cuando la masa ósea ectópica ya está instaurada (40,41).

Se ha postulado el uso de bifosfonatos en el momento en el que se detecta un incremento de la *ALP* sérica o de la presencia de la masa ósea mediante una técnica de imagen (41). Sin embargo, no se ha demostrado la efectividad de este fármaco para el tratamiento de la OH.

En la actualidad, se están testando fármacos agonistas del receptor del ácido retinoico en pacientes con FOP. En concreto, el uso de estos medicamentos en modelos animales de FOP han demostrado su eficacia como tratamiento ante

la formación de hueso ectópico (40,44,76). No obstante, se han descrito efectos adversos de toxicidad a nivel musculoesquelético tras el tratamiento crónico con este tipo de fármacos y su eficacia en humanos todavía no está esclarecida (40,44,76,77).

### 3.2.3. Resección quirúrgica de las masas óseas heterotópicas

La exéresis de las masas óseas ectópicas se lleva a cabo en pacientes con alteraciones importantes derivadas de las mismas. El principal objetivo es restaurar el rango de movimiento articular y reducir las complicaciones asociadas. El tiempo transcurrido para proceder con la resección de las masas óseas tras su detección es importante y depende del tamaño y de la etiología de la OH (Tabla 5). Sin embargo, la eliminación de las placas óseas heterotópicas no está exenta de complicaciones, entre las cuales destaca la recidiva por ser una de las más frecuentes (40,43,47,74). Así, la tasa de recidiva objetivable mediante técnicas de imagen entre los lesionados medulares es del 82-100%, siendo clínicamente significantes el 17-58% (59).

**Tabla 5. Momento óptimo de resección de masas óseas ectópicas en función de su etiología y tiempo transcurrido tras el incidente (40,47).**

Resección de masas óseas ectópicas	
Mecanismo lesional	Tiempo transcurrido (meses)
Traumatismo	6-9
Lesión medular	12
TCE	18
Cirugía de reemplazo articular	Lo antes posible

En base a lo anteriormente descrito, las estrategias terapéuticas actuales se centran en el abordaje profiláctico de la OH, y las herramientas para abordar la patología una vez que está instaurada son limitadas. Además, algunas de ellas son costosas, altamente invasivas, no aptas para todo el tipo de población como la pediátrica y no están exentas de efectos adversos y recidivas. Por lo tanto, es necesario investigar nuevas terapias que actúen como dianas terapéuticas ante la formación ectópica de hueso.

## **ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

1. Se ha propuesto que los factores humorales responsables del crecimiento óseo anómalo en la OHN tienen su origen en el tejido cerebral y nervioso lesionado. De hecho, se ha determinado que el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con TCE presenta propiedades osteoinductoras (48,49,61–65). Asimismo, se ha demostrado que la integridad nerviosa es fundamental para el mantenimiento de la masa ósea y que, una afectación de la misma se relaciona con un incremento del anabolismo óseo cuando está asociado a una fractura (66–68). Acorde con esto, nos planteamos la idea de que los astrocitos y nervios podrían liberar al medio factores osteoinductores similares a los que se podrían encontrar en el suero de los pacientes con riesgo de padecer OHN, los cuales favorecerían la formación de hueso ectópico en estos pacientes.

2. Durante los últimos años se han acumulado evidencias que sostienen la capacidad osteoinductiva del suero de pacientes que sufren OHN (40–43,46,47,57). Además, se ha descrito que, para que se produzca la formación de hueso ectópico en los pacientes que padecen OHN, debe existir un ambiente local y/o sistémico que favorezca la osteogénesis (40–44,47,49,52,53). A consecuencia de esto, nos planteamos la hipótesis de que en el suero de estos pacientes existen factores, hasta ahora no descritos, responsables de las propiedades osteoinductoras del mismo y que podrían desempeñar un papel clave en la formación ósea ectópica. En este sentido, la determinación del proteoma sérico de los pacientes con riesgo de desarrollar esta patología nos permitirá caracterizar el potencial ambiente favorecedor de la osteoblastogénesis.

3. Siendo conscientes del problema que supone tener un repertorio farmacológico reducido para el tratamiento de la OHN, nos planteamos la hipótesis de que fármacos utilizados en la práctica clínica con un perfil “osteoinhibidor” podrían bloquear los procesos osteoformadores presentes en los pacientes con riesgo de padecer OHN.

## OBJETIVOS

1. Establecer un modelo de OHN *in vitro* válido que permita el estudio de la patología. Este objetivo se asocia con la hipótesis 1.
2. Determinar la capacidad de los astrocitos de liberar factores osteoinductores *in vitro* y caracterizar mediante proteómica los factores secretados. Este objetivo está relacionado con la hipótesis 1.
3. Determinar la capacidad de los nervios y células nerviosas de liberar factores promotores del anabolismo óseo *in vitro* y caracterizar mediante proteómica los factores liberados por los mismos. Este objetivo se asocia con la hipótesis 1.
4. Determinar el potencial osteoinductivo del suero de pacientes potenciales de padecer OHN e identificar y/o aislar los principales factores humorales presentes en el suero de estos pacientes mediante proteómica. Este objetivo se relaciona con la hipótesis 2.
5. Estudiar el bloqueo farmacológico de los posibles efectos osteoinductivos de los factores humorales identificados. Este objetivo se relaciona con la hipótesis 3.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. MUESTRAS SANGUÍNEAS

#### 1.1. Obtención de suero y plasma de pacientes

##### 1.1.1. Selección muestral

Siguiendo los criterios de inclusión plasmados en la Tabla 6, se tomaron muestras de sangre de 38 pacientes y fueron clasificados en 4 grupos en función del riesgo de padecer OHN: grupo I (G1), pacientes con TCE y FHL con alto riesgo de sufrir OH; grupo II (G2), pacientes con TCE con menor riesgo de padecer la enfermedad; grupo III (G3), pacientes con FHL con bajo riesgo de padecer OH y grupo IV (G4), pacientes controles sin riesgo de padecer OH.

Todas las muestras sanguíneas fueron extraídas tras la aprobación del proyecto por parte del Comité Ético de Investigación del Área de Santiago y Lugo (código de referencia 2017/262). Asimismo, la recolección de las muestras se realizó tras la posterior firma por parte de los pacientes o familiares del consentimiento informado acerca del tratamiento de las muestras y del fin de la investigación, de acuerdo con la declaración de Helsinki. Con el fin de obtener información acerca de las comorbilidades, tratamientos u otras patologías que pudiesen alterar la validez de las muestras y descartar posibles sesgos en los resultados obtenidos, se accedió a la historia clínica de los pacientes. Esta información fue correctamente anonimizada y tratada bajo la regulación vigente.

**Tabla 6. Criterios de inclusión y selección muestral.**

<b>Grupos/Características</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
<i>TCE</i> <i>NISS</i>	>16	>16	-	-
<b><i>Politraumatizado</i></b>	<i>Glasgow</i>	<13	<13	-
<i>FHL</i>	Si	-	Si	-
<b><i>Edad</i></b>	18-65	18-65	18-65	18-65

*NISS* – Nueva escala de valoración de la gravedad de las lesiones (*New Injury Severity Score*, por sus siglas en inglés).

A todos estos pacientes se les extrajo sangre en el momento del ingreso hospitalario (D0), transcurridas las 24h (D1), 72h (D3) y 168h post-trauma (D7), a excepción del G4 al que solo se le efectuó una extracción sanguínea. De estas muestras se obtuvo el suero y el plasma para realizar los análisis proteómicos y estudiar su potencial osteoinductivo en células SaOS2. Las características demográficas y clínicas de cada grupo aparecen recogidas en la tabla 7.

**Tabla 7. Aspectos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en cada grupo muestral.**

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
<b><i>Tamaño muestral</i></b>	6	5	9	18
<b><i>Género</i></b> (M/F)	5/1	4/1	6/3	9/9
<b><i>Edad</i></b> (años/media)	21-77/39,5	34-72/51,4	19-83/50,9	23-83/39,6
<b><i>Fractura MMSS</i></b>	1	-	-	-
<b><i>MMII</i></b>	4	-	8	-
<b>Ambos</b>	1	-	1	-

MMSS – Miembros Superiores (fractura de húmero y radio), MMII – Miembros Inferiores (fractura de fémur, tibia y peroné).

### 1.1.2. Obtención del suero y plasma de las muestras sanguíneas

Para la obtención del suero, la sangre fue recogida en tubos de plástico Vacutainer™ *Advance* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), los

cuales presentan un gel separador que permite aislar el suero del resto de los componentes sanguíneos. Tras la extracción de la muestra, se realizaron entre cinco y seis inversiones suaves de los tubos. A continuación se dejaron reposar en posición vertical durante media hora, periodo tras el cual las muestras fueron centrifugadas a 2000g durante 10 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se recogió el suero localizado en la parte superior del gel en una campana de seguridad biológica de tipo II, y se procedió con su congelación a -80°C.

De forma similar se realizó la extracción del plasma. La única diferencia radicó en el tubo en el que fueron recolectadas las muestras. En este caso, la muestra fue recogida en tubos de plástico con K2-EDTA Vacutainer™ con tapón *Hemogard* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), el cual permite la obtención del plasma a partir de sangre completa. Siguiendo el protocolo anteriormente descrito para el suero, las muestras fueron centrifugadas y el plasma se almacenó a -80°C.

## 2. CULTIVOS CELULARES

### 2.1. Línea celular CCF-STTG1

La línea celular CCF-STTG1 es una línea de astrocitos humanos obtenida a partir de una donante de 68 años que padecía un astrocitoma en grado IV (78). El medio de cultivo de esta línea celular consiste en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, por sus siglas en inglés): *Hams* F12 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), y un 2% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Para el mantenimiento de estas células adherentes en cultivo se realizaron pases celulares cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia. Tras realizar un lavado con 1,5mL de tripsina/0,5% EDTA, se añadieron otros 2mL de la misma a la placa de cultivo en la que se cultivaron las células, y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se inactivó la tripsina con 6mL de medio y las células fueron despegadas y centrifugadas a 300g durante 6 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 6mL de medio. Finalmente

se sembraron las células en una nueva placa de 100mm (Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA) realizando un pase 1:2.

## 2.2. Línea celular SaOS2

La línea celular SaOS2 se trata de una línea osteoblástica humana procedente de un osteosarcoma de un donante de 11 años (79). El medio de cultivo empleado en estas células consiste en *DMEM:Hams F12* suplementado con un 10% de *FBS*, un 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), y glutamina 2mM. Para su mantenimiento en cultivo, se realizaron pases celulares cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia. Para ello se realizó un lavado con 2mL de tripsina/0,5% EDTA, y posteriormente se añadieron 4mL de la misma y se dejaron incubar durante 5 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se procedió con la inactivación de la tripsina añadiendo 9mL de medio. A continuación se centrifugaron las células a 300g, durante 5 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 9mL de medio y se sembraron en el matraz de cultivo de 75cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA) realizando un pase 1:3.

## 2.3. Línea celular C3H10T1/2

La línea celular C3H10T1/2 es una línea mesenquimal de ratón obtenida a partir del clon 8 de células embrionarias de ratón C3H (80,81). Estas células, por ser *MSCs*, conservan la capacidad de diferenciarse a diferentes estirpes celulares bajo el estímulo adecuado. Si bien es cierto que el modelo celular ideal sería aquel en el que las *MSCs* fuesen humanas, las C3H10T1/2 han demostrado poseer unas características muy similares a las de las *MSCs* primarias humanas, en relación a su capacidad de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condrocitos (82).

El medio de cultivo celular de esta línea se basa en *DMEM* con alta concentración de glucosa (4,5mg/mL) suplementado con un 10% de *FBS*, un 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) y glutamina 4mM. Para el mantenimiento de estas células en cultivo, se realizaron pases rutinarios cuando

las células alcanzaron el 80% de la confluencia. Para ello se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 1,5mL de tripsina/0,5% EDTA. Posteriormente se retiró la tripsina y se añadieron 2mL de la misma para incubar las células durante 6 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 6mL de medio de cultivo y las células fueron centrifugadas a 300g durante 6 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 6mL de medio de cultivo y se sembraron en la placa de 100mm con un pase 1:8.

#### **2.4. Línea celular ATDC5**

La línea celular ATDC5 es una línea de condrocitos de ratón generada a partir de un teratocarcinoma (83). Se trata de una línea que, debido a sus características, permite el estudio de los procesos fisiológicos del cartílago y la placa de crecimiento, y está considerada como una de las líneas celulares óptimas para mimetizar el proceso de osificación endocondral (84).

El mantenimiento de estas células requiere de medio de cultivo *DMEM:Hams* F12 suplementado con un 5% de *FBS*, un 2% de antibiótico (penicilina/estreptomocina), glutamina 4mM, 5µg/mL de apo-transferrina y selenito sódico 30nM. Los pases celulares de estas células se realizaron tras alcanzar el 80% de confluencia. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se efectuó un lavado con 1,5mL de tripsina/0,5% EDTA. Posteriormente, se retiró la misma y se añadieron 2mL de tripsina y se dejaron incubar las células durante 3-4 minutos. Transcurrido este tiempo, se bloqueó el efecto de la tripsina con 6mL de medio, las células se centrifugaron a 300g durante 6 minutos, se decantó el sobrenadante, se añadieron 6mL de medio de cultivo y se realizó la siembra de las células en placas de 100mm realizando un pase 1:8.

#### **2.5. Aislamiento y cultivo primario de células procedentes de nervio periférico**



Los nervios periféricos ciático, tibial posterior y safeno se obtuvieron de donantes humanos. El Comité Ético de Investigación del Área de Santiago y

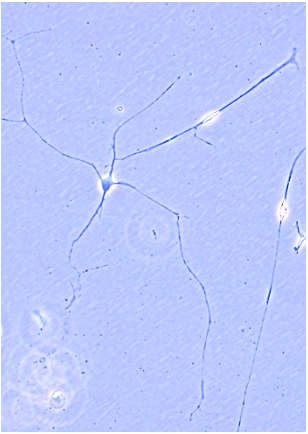
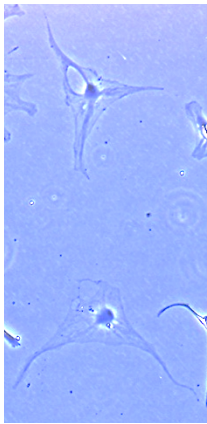
Lugo aprobó este procedimiento (código de registro: 2017/262). Asimismo, las muestras fueron extraídas tras la pertinente firma por parte de los familiares de los donantes del consentimiento informado acerca del tratamiento de las muestras y del fin de la investigación, de acuerdo con la declaración de Helsinki. Con la finalidad de obtener información acerca de las comorbilidades, tratamientos u otras situaciones patológicas que pudiesen alterar la validez de la muestra obtenida y, por lo tanto, los resultados del presente estudio, se accedió al historial clínico de los donantes. Toda la información procedente de los mismos fue correctamente anonimizada y tratada bajo la regulación vigente.

Para la extracción de células nerviosas periféricas se siguió el protocolo descrito por Morrissey *et al.* (85). Brevemente, una vez realizada la extracción del nervio, se procedió con la minuciosa limpieza del mismo, eliminando el epineuro, el tejido conectivo y los restos de vasos sanguíneos. A continuación, se cortaron los nervios en pequeños explantes nerviosos (EN) y se dispusieron en una placa de cultivo de 6 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), con una densidad de 3-4 EN por pocillo. Seguidamente se añadió el medio de nervio (MN) de tal modo que cubriese los EN, pero sin permitir la flotación de los mismos. Este medio se compone de *DMEM* con alta concentración de glucosa suplementado con un 10% de *FBS* y un 1% de antibiótico (penicilina y estreptomicina). Para el mantenimiento de este tipo de cultivos, el medio se cambió con una frecuencia de dos veces por semana. Trascurridos 7-10 días, se pudieron visualizar las células primarias procedentes de los EN. Una vez alcanzada la confluencia de las mismas, se trasladaron los EN a una nueva placa de cultivo y se reprodujo todo el proceso para obtener un mayor número de células. Con la finalidad de garantizar las propiedades celulares, este procedimiento no se repitió más de 4 ciclos. Asimismo, parte de estos EN fueron utilizados en los experimentos de cocultivo de nervio y SaOS2. Por su parte, las células nerviosas primarias obtenidas de los EN fueron utilizadas para los experimentos de cocultivo celular de células nerviosas procedentes de los EN (CEN) y SaOS2.

En relación con las células obtenidas de este cultivo, se pueden diferenciar dos tipos: las células de Schwann y los fibroblastos. Estas células son fácilmente

distinguibles en su visualización al microscopio, y su caracterización se basa en la morfología del soma y núcleo (Tabla 8) (85).

**Tabla 8. Caracterización morfológica al microscopio de las células de Schwann y fibroblastos procedentes de un nervio periférico (85).**

Tipo de célula	Soma	Núcleo	Aspecto al microscopio
Células de Schwann	Bipolar/tripolar con procesos largos	Oval	
Fibroblastos	Células planas y polimórficas	Redondo, ancho	

### 3. DIFERENCIACIÓN CELULAR

Se conoce como diferenciación celular al proceso por el cual las *MSCs* alcanzan su destino celular a osteoblasto, adipocito, condrocito, etc. En la presente tesis doctoral se han realizado diferenciaciones celulares de las células SaOS2 a osteoblasto, de las células C3H10T1/2 a adipocito y de las células

ATDC5 a condrocito. Un ciclo completo de diferenciación requiere de 21 días. Sin embargo, en los primeros días de diferenciación se pueden detectar cambios tempranos importantes que podrían repercutir en dicho proceso. Por ello, y basándonos en la experiencia previa del grupo, las SaOS2 fueron diferenciadas durante 3 días, las C3H10T1/2 durante 7 días y las ATDC5 durante 14 días. Con el fin de inducir la diferenciación celular, los medios fueron cambiados tres veces a la semana en el caso de las SaOS2 y las ATDC5, iniciando el proceso transcurridas las 24h post-siembra. En estas células se utilizó el mismo medio en todos los cambios realizados. Por su parte, en las C3H10T1/2, se emplearon dos medios para poder diferenciarlas a adipocitos: el medio de inducción el cual se cambió transcurridas las 6h post-siembra, y el medio de mantenimiento el cual reemplazó al de inducción transcurridos los 4 días tras la siembra. Todas las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA). Sin embargo, existen diferencias entre el número de células sembradas, así como en la composición del medio utilizado para diferenciarlas, aspectos que aparecen recogidos en la Tabla 9.

Por otra parte, las células SaOS2 fueron diferenciadas durante 0, 3, 7, 14 y 21 días en presencia de un 10% de *FBS* o de un 10% de suero procedente de los pacientes de los cuatro grupos (G1, G2, G3 y G4). Para ello, se sembraron 58000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente se retiró el medio de siembra y se añadió el medio de diferenciación de SaOS2 (MD) desprovisto de *FBS*. A continuación se añadió un 10% de *FBS* o un 10% del suero de los pacientes y se realizó la diferenciación de las células según lo previamente descrito.

**Tabla 9. Composición de los medios de diferenciación de las líneas celulares SaOS2, C3H10T1/2 y ATDC5.**

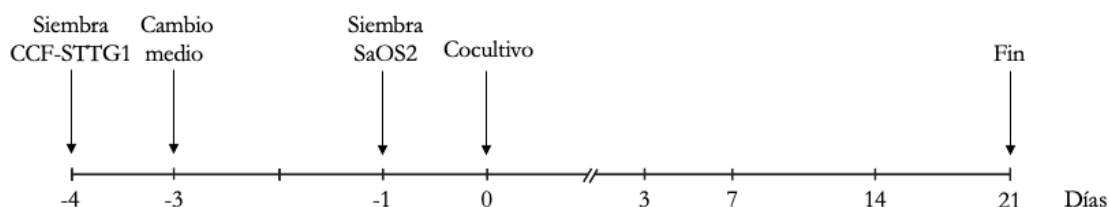
Tipo celular	Células/pocillo	Composición del medio
SaOS2	58000	<i>DMEM:Hams F12</i> <i>FBS 10%</i> Antibiótico 1% Glutamina 2mM Ácido ascórbico-2-fosfato 50µg/mL
C3H10T1/2	10000	<u>Medio de inducción</u> <i>DMEM</i> con alta concentración de glucosa <i>FBS 10%</i> Antibiótico 1% Glutamina 4mM Rosiglitazona 2µM IGF-1 20nM Dexametasona 1µM Indometacina 60µM Isobutylmetilxantina 0,5mM Insulina 10µg/mL  <u>Medio de mantenimiento</u> <i>DMEM</i> con alta concentración de glucosa <i>FBS 10%</i> Antibiótico 1% Glutamina 4mM Insulina 10µg/mL
ATDC5	40000 para D0 1000 para el resto de días	<i>DMEM:Hams F12</i> <i>FBS 5%</i> Antibiótico 2% Glutamina 4mM Apo-transferrina 5µg/mL Selenito sódico 30nM Insulina 10µg/mL

## 4. COCULTIVOS CELULARES

### 4.1. Cocultivos celulares de CCF-STTG1 y SaOS2

Para los cocultivos celulares se utilizaron insertos colgantes de cultivo celular Millicell® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con un tamaño de poro de 0,4µm y placas de 24 pocillos. En el inserto se cultivaron las CCF-STTG1, a una densidad de 10500 células/inserto. Al día siguiente, se realizó el cambio de medio de los astrocitos por el MD y se mantuvieron en cultivo durante 72h.

Transcurridas las 48h de la siembra de los astrocitos, se sembraron las SaOS2 en las placas de 24 pocillos a una densidad de 58000 células/pocillo. Pasadas las 24h de la siembra de las SaOS2, se unificaron ambos cultivos para formar un cocultivo de CCF-STTG1 y SaOS2. En este instante, se les cambió a ambas células el medio por un nuevo MD y se mantuvieron en cocultivo durante 3, 7, 14 y 21 días.



**Figura 4. Esquema de desarrollo del modelo de cocultivo celular de astrocitos y osteoblastos.**

### 4.2. Cocultivos celulares de explantes nerviosos y SaOS2

En relación a los cocultivos de EN y SaOS2, se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para los astrocitos. La única diferencia radica en que en lugar de los astrocitos, se colocó un EN en el inserto. Cabe destacar que todos los EN presentaron dimensiones similares en todos los experimentos. Trascorridas las 24h horas post-siembra de los EN, se retiró el MN, se intercambió por el MD, y se mantuvieron en cultivo durante 72h. Por su parte, las células SaOS2 fueron sembradas 48h después de la siembra de los

EN. Al día siguiente de la siembra de las SaOS2 se unificaron ambos cultivos celulares obteniendo un cocultivo formado por un EN en la parte superior y células SaOS2 en la parte inferior. En este momento, se procedió con el cambio de medio y se añadió el MD. Finalmente se mantuvo el cocultivo durante 3 días.

### **4.3. Cocultivos celulares de células procedentes de los explantes nerviosos y SaOS2**

En el caso de los cocultivos realizados con las CEN, el protocolo seguido fue exactamente igual al descrito con anterioridad para los EN. Sin embargo, difiere de este en que las células se sembraron una vez alcanzada la confluencia en el pocillo con los EN. Para ello, se sembraron las CEN en los insertos con una densidad de 21000 células/inserto. Posteriormente se sembraron las SaOS2 para constituir el cocultivo de CEN y SaOS2, y se mantuvo el mismo durante 3 días.

## **5. CULTIVOS CELULARES CON MEDIOS CONDICIONADOS**

### **5.1. Obtención de los medios condicionados**

#### **5.1.1. Medios condicionados por los astrocitos**

Los astrocitos fueron sembrados en placas de 6 pocillos con una densidad de 332500 células/pocillo. Trascorridas las 24h post-siembra, se realizó un cambio de medio y se añadieron 2mL de MD. En estas condiciones se dejó que los astrocitos condicionaran el medio durante 72h obteniéndose el medio condicionado por los astrocitos (MCA), el cual fue recogido bajo condiciones de esterilidad para estimular a las SaOS2 y a las C3H10T1/2.

#### **5.1.2. Medios condicionados por los explantes nerviosos**

Tras el procesado de la muestra primaria nerviosa, los EN fueron colocados en una placa de 6 pocillos con una densidad de 3-4 EN/pocillo. Pasado el mes

y medio de la siembra de los EN, y transcurridas 72h tras el condicionamiento del medio (previo al cambio del mismo), se recogieron los medios condicionados por los explantes nerviosos (MCEN) en condiciones de esterilidad para estimular a las SaOS2 y a las C3H10T1/2.

## 5.2. Cultivos celulares con los medios condicionados

### 5.2.1. Cultivos celulares con los medios condicionados por los astrocitos

#### 5.2.1.1. Cultivos celulares de SaOS2 y C3H10T1/2 con el medio condicionado por los astrocitos

Una vez obtenido el MCA, éste fue utilizado para estimular las diferenciaciones de SaOS2 y de las C3H10T1/T2, tal y como se describió previamente.

En el caso de las SaOS2, trascurridas las 24h post-siembra se efectuó el cambio del medio de las mismas por el MCA, y se dejaron diferenciar durante 3 días (Figura 5).



Figura 5. Esquema de desarrollo del modelo de cultivo celular con el MCA y osteoblastos.

Por su parte, en las C3H10T1/2, debido a la diferencia en la composición de sus medios de diferenciación y el de las SaOS2, se procedió con la concentración y purificación de las proteínas de 2mL de MD y MCA, utilizando las unidades de filtrado centrífugo de 3kDa *Amicon® Ultra – 0.5mL Centrifugal Filters Ultracel 3K* (Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU) atendiendo a las instrucciones del proveedor. Una vez finalizado el proceso se

resuspendieron los pellets en el medio de diferenciación correspondiente a la línea celular, se filtraron con un filtro de 0,2µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se dejaron diferenciar durante 7 días tal y como se describió con anterioridad.

5.2.1.2. *Cocultivos celulares de explantes nerviosos, células procedentes de los explantes nerviosos y SaOS2 estimulados con el medio condicionado por los astrocitos*

En este modelo experimental confluyen los experimentos de cocultivo de EN y CEN con las SaOS2, junto con los cultivos de estas células realizados en presencia del MCA. Para ello, se llevaron a cabo experimentos paralelos de condicionamiento de medio por parte de los astrocitos y del cocultivo de EN y CEN. La diferencia de este modelo en relación al cocultivo previamente descrito radica en el momento de la unificación del mismo. En este caso, el cambio de medio no se realizó por el MD, sino por el MCA (Figura 6).

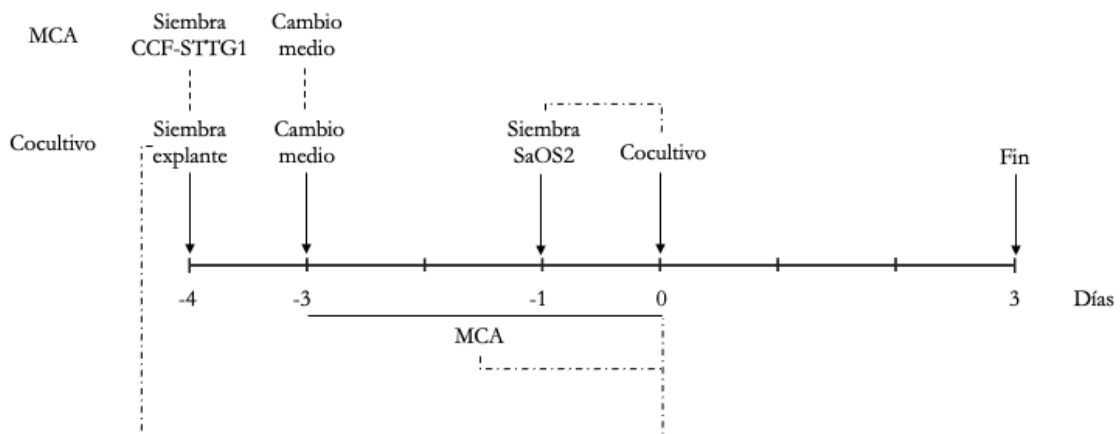


Figura 6. Esquema de desarrollo del modelo de cocultivo celular de EN y osteoblastos en presencia del MCA.

5.2.2. Cultivos celulares con los medios condicionados por los explantes nerviosos

Los MCEN fueron concentrados utilizando las unidades de filtrado centrífugo de 3kDa Amicon® Ultra – 0.5mL Centrifugal Filters Ultracel 3K, según las especificaciones del proveedor. A continuación se resuspendieron con el medio de diferenciación de C3H10T1/2, se filtraron con un filtro de 0,2µm y

se realizó la diferenciación a adipocito de estas células en presencia y ausencia del MCEN durante 7 días, tal y como se ha detallado previamente.

## 6. TRATAMIENTOS

### 6.1. Tratamientos con estímulos inflamatorios

Para determinar el efecto de un factor inflamatorio externo al proceso de diferenciación de las SaOS2 estimuladas con el MCA, las células SaOS2 fueron sembradas y estimuladas con el medio condicionado en presencia y ausencia de 0,1 ng/mL de *IL1 $\beta$*  y 100 ng/mL de lipopolisacárido (LPS). Para ello, una vez que las SaOS2 completaron el ciclo de diferenciación de 3 días con el MCA, estas células fueron tratadas con los estímulos inflamatorios y se dejaron diferenciar durante 48h más (Figura 7).

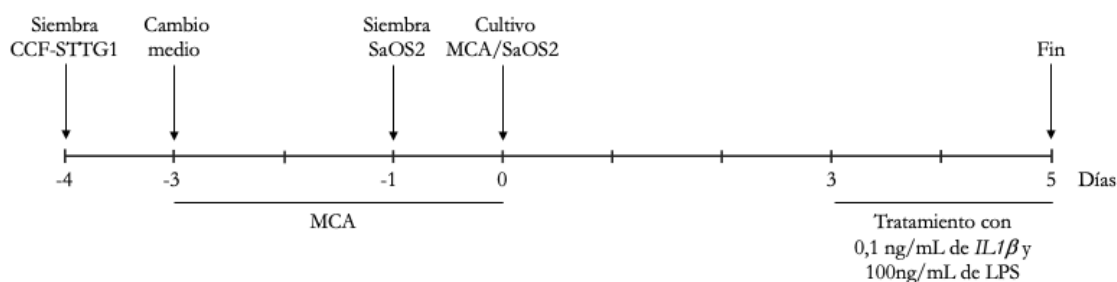


Figura 7. Esquema de desarrollo del modelo de cultivo celular con el MCA y osteoblastos en presencia de estímulos inflamatorios.

### 6.2. Apartado afectado por la protección de derechos

### 6.3. Triterapia

El concepto triterapia (TT) hace referencia a un tratamiento patentado por nuestro grupo (número de patente: EP19382094) formado por la combinación de tres fármacos: un antidiabético oral, la pioglitazona (10nM); un AINE, la indometacina (60 $\mu$ M); y un corticoide, la dexametasona (1 $\mu$ M). Las células SaOS2 estimuladas con el MCA fueron tratadas con la TT en el momento en que se añadió el medio condicionado. A continuación, se dejaron diferenciar las células bajo estas condiciones durante 3 días.

Por otra parte, el MCEN fue recogido y usado para estimular las SaOS2. En el momento de reemplazo de los medios por el MCEN, las SaOS2 fueron tratadas con la T<sup>T</sup> y se dejaron diferenciar durante 3 días.

## **7. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR**

### **7.1. Estudio de la viabilidad celular mediante la cuantificación del ácido ribonucleico y conteo celular**

Para el estudio de la viabilidad celular se partió de la base de que la cantidad de ácido ribonucleico (ARN) y número de células vivas deben ser directamente proporcionales y, por lo tanto, criterios representativos de este índice. Partiendo de esta premisa, se cuantificó el ARN de las C3H10T1/2 diferenciadas utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop One*<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y se compararon las diferentes medidas obtenidas entre las muestras. Paralelamente a este método, se realizaron fotos al microscopio de las diferentes condiciones. Posteriormente, se dividió la fotografía en 3 rectángulos de igual tamaño y se posicionaron en el mismo lugar de las imágenes. A continuación se procedió con el conteo de las células vivas y se comparó el número obtenido en relación con el resto de muestras.

### **7.2. Estudio de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT**

Por otra parte, la viabilidad celular se estudió mediante el ensayo MTT, el cual permite estudiar la actividad metabólica de las células en cultivo, la proliferación celular y la citotoxicidad. Para la realización de esta técnica se emplea el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil-tetrazol (MTT), el cual es metabolizado por enzimas deshidrogenasas mitocondriales para dar lugar a la formación de sal de formazán, cuya absorbancia es medible a una longitud de onda de entre 540-570nm con un espectrofotómetro. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de sal de formazán producida (86,87).

Para realizar estos estudios, las células C3H10T1/2 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 6000 células/pocillo. Transcurridas las

6h post-siembra, se les cambió el medio por el medio de inducción de adipogénesis en presencia o ausencia del MCA, el cual fue previamente concentrado con las unidades de filtrado centrífugo de 3kDa *Amicon® Ultra – 0.5mL Centrifugal Filters Ultracel 3K* y resuspendido en el medio de diferenciación de adipogénesis. Transcurridos los 4 días tras la siembra, se les cambió el medio por el medio de mantenimiento y se volvieron a estimular con el MCA. Bajo estas circunstancias, se mantuvieron en cultivo durante 7 días para completar la primera etapa de la diferenciación celular. En ese punto, y 4h previas al momento en que se finalizó el experimento, se añadió el MTT (0,5mg/mL) y se incubaron durante 4h a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez finalizado este tiempo, se añadieron 100µL/pocillo de una solución dodecil sulfato sódico (*SDS*, por sus siglas en inglés) 10% y 0,01M de ácido clorhídrico fumante para detener la reacción enzimática y facilitar la solubilización de la sal de formazán. Bajo estas condiciones, la placa se mantuvo en incubación durante toda la noche a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se procedió con la lectura de la placa en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570nm. El resultado obtenido se relacionó con la capacidad proliferativa de las células bajo las diferentes condiciones.

## 8. TINCIONES

### 8.1. Tinción del citoesqueleto y núcleo celular *in vivo*

La actina y la tubulina son los principales componentes del citoesqueleto celular. Estos componentes son indispensables para los procesos biológicos celulares y están relacionados con la estabilización de la forma celular y la migración celular. La visualización de estos componentes es posible, previa tinción, mediante técnicas de microscopía. Además, la tinción DAPI permite la visualización al microscopio de los núcleos celulares.

Para realizar estos experimentos, las células SaOS2 fueron sembradas sobre un cubreobjetos dispuesto en una placa de 24 pocillos a una densidad de 58000 células/pocillo. Estas células fueron estimuladas con el MCA y diferenciadas a osteoblasto durante 3 días. Transcurrido el periodo de diferenciación, se retiró el medio del pocillo y se realizó la tinción siguiendo las instrucciones del

proveedor. Para ello, se añadió el cóctel de tinción compuesto por el reactivo de tinción de tubulina, actina y NucBlue™ y se incubaron durante media hora. A continuación se retiró el medio y se añadió Probanecid 1X disuelto en tampón fosfato salino (*PBS*, por sus siglas en inglés). Luego se añadieron 8µL del medio de montaje a un portaobjetos y se posicionó el cubreobjetos con las células de modo que las SaOS2 estuviesen en contacto con el medio de montaje. Finalmente se visualizaron las células al microscopio confocal y se tomaron las fotografías pertinentes.

## 8.2. Tinción rojo de aceite O

Los estudios de la capacidad de diferenciación de las células C3H10T1/2 en presencia y ausencia de MCA se realizaron mediante la tinción rojo de aceite O. El rojo de aceite O es un colorante lipofílico capaz de teñir los depósitos grasos intracelulares.

Para realizar esta tinción, las células fueron fijadas con formol 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró el formol y se dejaron secar las células por completo. A continuación se incubaron las células con rojo de aceite O 21% durante 10 minutos y, posteriormente, se realizaron cuatro lavados con agua destilada para eliminar los restos de tinción inespecífica. Finalmente se añadieron 500µL de agua destilada y se tomaron las fotografías al microscopio.

## 9. AISLAMIENTO DEL ARN

La extracción del ARN celular de los cultivos celulares se llevó a cabo utilizando los reactivos TriReagent® y el kit de extracción E.Z.N.A. Total RNA Kit I®.

Una vez finalizados los experimentos, tal y como se ha descrito previamente, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lisadas directamente en la placa de cultivo añadiendo 500µL de TriReagent® en cada pocillo. Para garantizar el lisado celular, se pipeteó varias veces arriba y abajo el reactivo con las células hasta obtener una mezcla no viscosa. A continuación, se transfirió el lisado a

los tubos de microcentrífuga de 2mL, se añadieron 100µL de cloroformo, se agitaron los tubos intensamente durante 5 segundos y, posteriormente, se dejaron incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron los tubos durante 15 minutos a 12000g y 4°C. Una vez finalizada la centrifugación, se recogió la fase acuosa (superior) de los tubos y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga. A partir de aquí se procedió con el aislamiento del ARN siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de extracción E.Z.N.A. Total RNA Kit I®. Para ello se hizo una mezcla homogénea (1:1) de la fase acuosa con etanol 70% y se transfirió a las columnas del kit de extracción. Éstas fueron centrifugadas a 10000g durante 1 minuto y se descartó el eluido. A continuación se procedió con los lavados del ARN, el cual quedó retenido en la membrana de la columna durante la centrifugación. Para ello se realizó un lavado con el reactivo *RNA Wash Buffer I* y dos lavados con el *RNA Wash Buffer II*. Una vez finalizados los lavados, se procedió con el secado de la membrana, para lo cual las muestras fueron centrifugadas durante 2 minutos, a 14000g y temperatura ambiente. Una vez finalizado este paso, se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5mL donde se eluyó el ARN con 35µL de agua libre de ARNasas. Para finalizar, el tubo se centrifugó durante 2 minutos a 14000g a temperatura ambiente y se obtuvo el ARN.

Finalizada la extracción del ARN, se midieron la calidad (ratio de absorbancia 260/280 y 260/230) y la concentración del mismo utilizando un espectofotómetro *NanoDrop One*®.

## 10. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 10.1. Retrotranscripción

Previamente a la retrotranscripción (RT), el ARN extraído fue digerido con ADNasa para eliminar las impurezas de ácido desoxirribunucleico (ADN) genómico que pudiera estar presente en la muestra. Para ello, se cargó la misma cantidad de ARN de cada muestra y se incubaron, siguiendo las instrucciones del proveedor, con una mezcla de ADNasa, el tampón y el agua durante diez minutos a 37°C.

A partir del producto obtenido de la digestión se realizó la RT. Para ello se tomaron 2µL del ARN digerido y se realizó la RT siguiendo las instrucciones del fabricante. Por cada muestra se añadieron 8µL de los reactivos del kit de RT y se realizó la misma durante 30 minutos a 37°C, y 5 minutos a 95°C con la finalidad de inactivar la enzima retrotranscriptasa y degradar el ARN. Como producto de la RT se obtuvo el ADN complementario (ADNc), el cual se conservó a -20°C para preservar la integridad del mismo.

## 10.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (*PCR*, por sus siglas en inglés) se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor. Todas las reacciones de *PCR* (gen de interés, gen normalizador y control negativo) se realizaron por duplicado y con un volumen final de 10µL. La mezcla final de la reacción estuvo compuesta por los siguientes reactivos:

- 5µL de mezcla maestra 2X
- 0,9µL de cebadores 10µM
- 3,1µL de agua libre de ARNasas y DNAsas
- 1µL de ADNc

Se utilizó el sistema SYBR Green y se emplearon los cebadores que aparecen detallados en la tablas 10 y 11.

**Tabla 10. Listado de cebadores humanos usados en la técnica de *PCR* en tiempo real.**

Gen	Símbolo	Secuencia (5'-3') cebador delantero	Secuencia (5'-3') cebador inverso
Axina 2	AXIN2	AAAGAGAGGAGGTTTCAGATG	CTGAGTCTGGGAATTTTTCTTC
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGFβ	GGGCAGGGTTATTTAATATGG	AATCAGGCATCGAGACAG
Factor de transcripción relacionado con RUNT tipo 2	RUNX2	AAGCTTGATGACTCTAAACC	TCTGTAATCT GACTCTGTCC
Factor inhibidor de la leucemia	LIF	TCTCTATTACACAGCCCAG	AAGGTACACGACTATGCG
Fosfatasa alcalina	ALPL	TCTTCACATT TGGTGGATAC	ATGGAGACAT TCTCTCGTTC

Tabla 10. Continuación

Gen	Símbolo	Secuencia (5'-3') cebador delantero	Secuencia (5'-3') cebador inverso
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa 1	HPRT1	ATAAGCCAGACTTTGTTGG	ATAGGACTCC AGATGTTTCC
Interleuquina 6	IL6	GCAGAAAAAGGCAAAGAATC	CTACATTTGCCGAAGAGC
Ligando del factor nuclear kappa beta	RANKL	TGGTTCCCATAAAGTGAGTC	GAAGATACTCTGTAGCTAGGTC
Molécula de adhesión celular vascular	VCAM	ACTTGATGTTCAAGGAAGAG	TCCAGTTGAACATATCAAGC
Osteoactivina	GPNMB	CAGATCAGAT TCCTGTGTTTG	ACAGTATGAT TGGTGGAAC
Osteocalcina	BGLAP	TTCTTTCCTCTTCCCCTTG	CCTCTTCTGGAGTTTATTTGG
Osteopontina	SPP1	GACCAAGGAAAACACTACTAC	CTGTTTAACTGGTATGGCAC
Osteoprotegerina	OPG	ATAGATGTTACCCTGTGTGAG	AAGACACTAAGCCAGTTAGG
Podoplanina	PDPN	AAGATGGTTTGTCAACAGTG	GTACCTCCCGACATTTTTC
Proteína morfogénica del hueso, 2	BMP2	TCCACCATGA AGAATCTTTG	TAATTCGGTGATGGAAACTG
Proteína morfogénica del hueso, 4	BMP4	AGAACATCTGGAGAATCC	AATGTTTATACGGTGGAAGC
Proteína quimiotáctica de monocitos 1	CCL2	AGACTAACCCAGAAACATCC	ATTGATTGCATCTGGCTG
Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGFR $\beta$	GGGAAGAGAAGTTTGAGATTC	TTCTTTTTGTAACCTTCGCC
Grupo de diferenciación 44	CD44	TTATCAGGAGACCAAGACAC	ATCAGCCATTCTGGAATTTG

Tabla 11. Listado de cebadores de ratón usados en la técnica de *PCR* en tiempo real.

Gen	Símbolo	Secuencia (5'-3') cebador delantero	Secuencia (5'-3') cebador inverso
Adiponectina	ADIPOQ	CCACTTTCTCCTCATTCTG	CTAGCTCTCAGTTGTAGTAAC
Axina 2	AXIN2	AAGATCACAAAGAGCCAAAG	GAAAAAGTAGGTGACAACCAG
Colágeno tipo II	COL2A1	GCGATGACATTATCTGTGAAG	TATCTCTGATATCTCCAGGTTCC
Colágeno tipo X	COLX	TCATGGGATGTTTTATGCTG	TCTTACTGGAATCCCTTTACTC
Factor de transcripción de la región determinante del sexo Y-box-9	SOX9	CTCATTACCATTTTGAGGGG	AAAATACTCTGGTTGCAAGG

Tabla 11. Continuación

Gen	Símbolo	Secuencia (5'-3') cebador delantero	Secuencia (5'-3') cebador inverso
Factor de transcripción relacionado con RUNT tipo 2	RUNX2	ACAAGGACAGAGTCAGATTAC	CAGTGTCATCATCTGAAATACG
Fosfatasa alcalina	ALPL	ATCCCACTA TGTCTGGAAC	CTCAAAGAGACCTAAGAGGTAG
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa 1	HPRT1	AGGGATTTGA ATCACGTTTG	TTTACTGGCA ACATCAACAG
Interleuquina 6	IL6	AAGAAATGATGGATGCTACC	GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
Molécula de adhesión celular vascular	VCAM	ACTGATTATCCAAGTCTCTCC	CCATCCACAGACTTTAATACC
Osteoactivina	GPNMB	TGATAACAGATCAGATCCCTG	AGGAAGATCTCATCAGACAAG
Osteopontina	SPP1	GGATGAATCT GACGAATCTC	GCATCAGGAT ACTGTTTCATC
Perilipina 2	PLIN2	ATAAGCTCTA TGTCTCGTGG	GCCTGATCTT GAATGTTCTG
Proteína ligante a ácidos grasos	FABP4	GTAAATGGGG ATTTGGTCAC	TATGATGCTC TTCACCTTCC
Proteína quimiotáctica de monocitos 1	CCL2	CAAGATGATCCCAATGAGTAG	TTGGTGACAAAACTACAGC
Receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma	PPARG	AAAGACAACG GACAAATCAC	GGGATATTTTT GGCATACTCTG
Grupo de diferenciación 44	CD44	GAATTAGCTGGACTCAAG	CACCTTCTCCTACTATTGACC

Todas las reacciones de *PCR* se realizaron siguiendo el mismo programa, consistente en: 1 minuto a 95°C, 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C.

#### 10.2.1. Cuantificación relativa

El equipo utilizado para realizar las amplificaciones y cuantificaciones relativas fue el *QuantStudio*® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Cada muestra fue amplificada dos veces, una con los cebadores del gen de interés y otra con los cebadores del gen normalizador *HPRT1*. El gen

normalizador garantiza el control de carga al no sufrir variaciones en su expresión en relación a diferentes tratamientos o estado de la diferenciación celular.

Para realizar la cuantificación relativa se ha utilizado el método  $\Delta\Delta Ct$ . El término  $Ct$  hace referencia al ciclo a partir del cual la amplificación empieza a ser estadísticamente significativa en relación al ruido de fondo. Teniendo en cuenta que la relación entre  $Ct$  y la concentración de ADNc es inversamente proporcional, y que en cada uno de los 45 ciclos de la *PCR* se duplican las copias, el nivel de expresión de cada gen ( $L$ ) se puede expresar como:

$$L = 2^{-Ct}$$

Debemos tener en cuenta que, para cada gen, el nivel de carga de las muestras puede sufrir pequeñas variaciones. Para evitar esto, se normalizó la expresión de cada gen respecto a la expresión de un gen normalizador. Su representación sería la siguiente:

$$\frac{2^{-Ct(GI)}}{2^{-Ct(Nor)}} = 2^{-[Ct(GI)-Ct(Nor)]} = 2^{-\Delta Ct}$$

Tras la normalización del gen de interés, se prosiguió con la cuantificación relativa de cada una de las muestras respecto al calibrador. Con esto se determinó la variación de expresión génica del gen de interés en una muestra respecto al control. El calibrador fue asignado al ADNc de la muestra control, o bien del MD, al cual se le asignó el valor de 1. Las demás muestras fueron referidas a este valor, determinando de este modo la cuantificación relativa en relación al calibrador.

Esta cuantificación relativa se calcula dividiendo la expresión normalizada del gen de interés en la muestra problema, entre la expresión del gen de interés en el control (calibrador). Su representación es la siguiente:

$$\frac{2^{-\Delta Ct(GI)}}{2^{-\Delta Ct(Nor)}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde  $\Delta\Delta Ct$  es igual a  $\Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{control})$

### 10.2.2. Controles de calidad

En todas las *PCR* se realizó un control negativo de calidad en el cual no se incluyó el ADNc. Esto permitió diferenciar si el resultado obtenido fue debido a la hibridación de los cebadores con el ADNc problema, o bien a la formación de dímeros entre ellos, lo cual daría lugar a un falso positivo. Asimismo, se realizó un control de especificidad ulterior con la realización de una curva de disociación, la cual permite determinar la temperatura de fusión específica de cada fragmento amplificado en cada gen y par de cebadores, confirmando de este modo la ausencia de dímeros de cebadores que puedan resultar en un falso positivo.

## 11. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA

### 11.1. *Western Blot*

Para analizar la expresión de proteínas en los sobrenadantes de los cultivos celulares y en los sueros de los pacientes se realizaron ensayos de *western blot*. Para ello, se precipitaron 200 $\mu$ L de los sobrenadantes de los cultivos celulares y 100 $\mu$ L de los sueros de los pacientes mediante metanol y cloroformo. Con tal fin, se tomaron dichas muestras y se transfirieron a un tubo de 1,5mL. Posteriormente se añadieron 800 $\mu$ L o 400 $\mu$ L de metanol 100% en función de si se procesó un sobrenadante o un suero, y se agitaron con un mezclador de vórtice. Luego se añadieron 200 $\mu$ L o 100 $\mu$ L de cloroformo dependiendo de si la muestra correspondía a un sobrenadante celular o un suero, y se agitó el tubo nuevamente. A continuación se añadieron 600 $\mu$ L o 300 $\mu$ L de agua destilada atendiendo a si la muestra era un sobrenadante procedente de un cultivo celular

o un suero, y se centrifugaron a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la centrifugación, se descartó con una micropipeta la parte superior a la banda proteica, se añadieron 600 $\mu$ L de metanol 100% en el caso de los sobrenadantes o 300 $\mu$ L del mismo en el caso de los sueros, se agitaron los tubos hasta romper dicha banda y se centrifugaron a 300g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se descartó por completo el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Una vez finalizada la precipitación de proteínas, se resuspendieron los pellets de los sobrenadantes de los cultivos celulares y los procedentes del suero de los pacientes en 50 $\mu$ L y 240 $\mu$ L de *Ripa Buffer* respectivamente. Las muestras se cargaron en igualdad de volumen y éstas fueron separadas por tamaño en geles de acrilamida con dos fases: la superior (gel concentrador) al 5% y la inferior (gel separador) al 10%.

La electroforesis se realizó empleando el tampón comercial de migración Tris/Glicina/*SDS* 10X, diluido diez veces en agua y metanol 20%. Una vez separadas las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno previamente hidratada en metanol y agua. La transferencia se realizó con el aparato de transferencia semihúmeda *TransBlot® SD Cell* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Finalizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas usando como bloqueo una solución al 0,5% de leche desnatada en TBS-T (NaCl 1,37 M, Trizma® Base 20mM, pH7,6, TWEEN® 20 0,1%) con la bomba de vacío *SNAP i.d. 2-0* (Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU). A continuación se añadió el anticuerpo primario disuelto en el tampón de bloqueo formado por un 5% de leche desnatada y TBS-T (dilución 1:1000), y se dejaron incubar las membranas a 4°C en agitación continua durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron cuatro lavados de las membranas con TBS-T utilizando la bomba de vacío *SNAP i.d. 2-0*. A continuación se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario pertinente disuelto en el tampón de bloqueo (dilución 1:2000) durante 1h, a temperatura ambiente y en agitación continua. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron cuatro lavados con TBS-T utilizando el *SNAP i.d. 2-0*. Posteriormente se procedió con el revelado utilizando el *Immobilon® Western*, y la quimioluminiscencia fue detectada

utilizando el *ChemiDoc MP Imaging System* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Las imágenes obtenidas fueron cuantificadas utilizando los programas *Image Lab™ Software* (Image Lab™ 6.0.1, Bio-Rad Laboratories, EEUU) e *ImageJ* (ImageJ 1.51s, NIH, EEUU).

## 11.2. Estudios de proteómica

El secretoma de los cultivos celulares correspondientes con el MCA y el MCEN con sus respectivos controles, así como los sueros de los pacientes fueron analizados mediante proteómica utilizando el aparato TOF/TripleTOF 6600 (Sciex, EEUU). Todas las muestras fueron analizadas de forma cualitativa (*Data-dependent acquisition, DDA*) y cuantitativa (*Sequential window acquisition of all theoretical mass spectra, SWATH*). De los datos obtenidos, se escogieron aquellas proteínas que estuviesen por encima del 5% de la tasa de descubrimientos falsos (*FDR*, por sus siglas en inglés). A continuación, se realizó un enriquecimiento del proteoma con el programa *FunRich* (88). Asimismo, se realizó una tabla de correlación partiendo de las áreas obtenidas en el análisis de *SWATH* con los cambios en la expresión génica producidos por esos sueros en las células SaOS2. Posteriormente se realizó un mapa de correlación representando solo las correlaciones que implicasen los genes estudiados mediante *PCR*.

## 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de este trabajo se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media (*SEM*, por sus siglas en inglés) de, al menos, tres experimentos o muestras independientes y fueron analizados mediante el programa estadístico *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc. 8, EEUU) y R (RStudio 1.3.1093, EEUU). Para dicho análisis se emplearon el test t de *Student* paramétrico y no paramétrico, atendiendo a la procedencia de las muestras. Se consideró significativo un valor de p menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ). En la representación gráfica, los resultados se expresaron como \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$ , \*\*\* para  $p < 0,001$  y \*\*\*\* para  $p < 0,0001$ . Para las correlaciones, se

María Guillán Fresco

empleó el análisis de correlación no paramétrico de *Pearson*, aplicando un 5% del *FDR*.

## 13. LISTADO DE LÍNEAS CELULARES, ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Tabla 12. Listado de líneas celulares, anticuerpos y reactivos

<b>Líneas celulares</b>	
<i>Nombre</i>	<i>Proveedor</i>
ATDC5	Riken Cell Bank, Japan
C3H10T1/2	Dra. Pardo, Instituto IDIS, Santiago, España
CCF-STTG1	CLS, Eppelheim, Alemania
SaOS2	CLS, Eppelheim, Alemania
<b>Anticuerpos</b>	
<i>Nombre</i>	<i>Proveedor</i>
Anticuerpo primario PolyAb	Proteintech, Alemania
Anticuerpo secundario	Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	USA
<b>Reactivos</b>	
<i>Nombre</i>	<i>Proveedor</i>
Ácido ascórbico-2-fosfato	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ácido clorhídrico fumante	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
ACTRAPID 100 UI/ML	Servicio de farmacia del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela
Agua ultrapura libre de ARNasas y ADNasas	Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
Apo-transferrina	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cebadores	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
CellMask™ Green Actin Tracking Stain	Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
Cloroformo	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

**Tabla 12. Continuación**

Reactivos	
Dexametasona	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
E.Z.N.A. Total RNA Kit I®	Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA
Etanol	VWR BDH Chemicals, Darmstadt, Alemania
FBS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formol 4%	Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
Glutamina	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, USA
IGF-1	Tebu-Bio Spain S.L. España
IL1β	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Immobilon® Western	(Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU)
Indometacina	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isobutilmetilxantina	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kit de digestión	Lucigen, WI, USA
Kit de tinción del citoesqueleto y DAPI	Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
LPS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Metanol	(Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU)
Mezcla maestra para PCR	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Medio DMEM High Glucose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Medio DMEM:Hams F12	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
MTT	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaCl	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
NucBlue™ Live Cell Stain	Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
ReadyProbes™ Reagent	USA
PBS	Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA

**Tabla 12. Continuación**

Reactivos	
Penicilina/Estreptomicina	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pioglitazona	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ripa Buffer	(Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU)
Rojo de aceite O	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rojo de alizarina	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rosiglitazona	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Selenito sódico	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tripsina/EDTA 0,5%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
TriReagent®	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris/Glicina/SDS 10X	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trizma® Base	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tubulin Tracker™ Deep Red	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TWEEN® 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA



## **RESULTADOS**



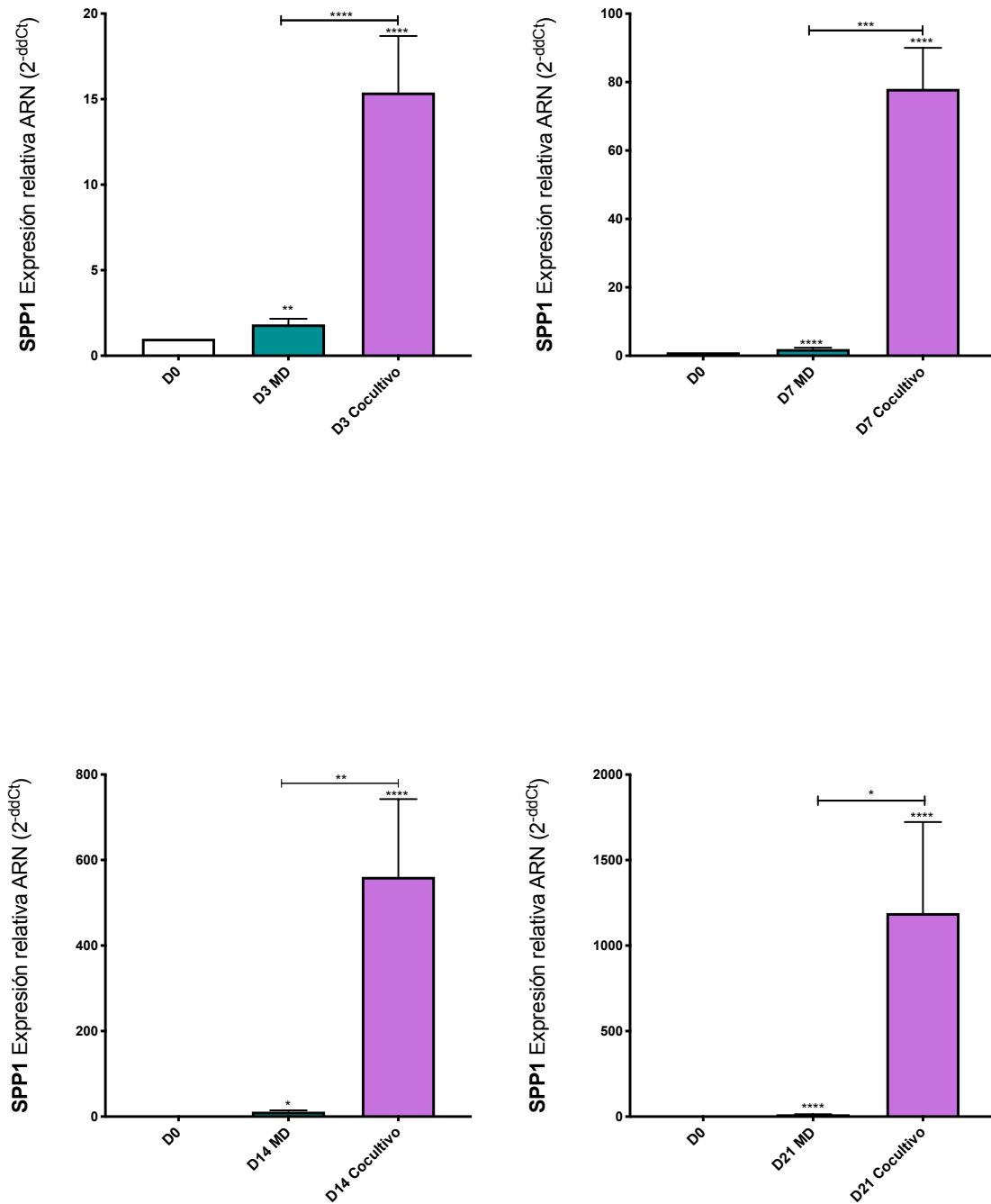
## RESULTADOS

### 1. EFECTO DE LOS ASTROCITOS EN LA OSTEOLASTOGÉNESIS

#### 1.1. Estudio del efecto anabólico de los astrocitos sobre los osteoblastos

En el contexto de un TCE, los astrocitos desempeñan un papel importante en los procesos fisiopatológicos y de reparación a través de la liberación de numerosos factores (17). Con la finalidad de estudiar la potencial contribución de estas células en la OHN, se cocultivaron astrocitos (CCF-STTG1) y osteoblastos (SaOS2) y se dejaron diferenciar durante tres, siete, catorce y veintiún días a osteoblasto. Interesantemente, el cocultivo celular promovió la osteoblastogénesis, al aumentar la expresión génica en los osteoblastos de marcadores esenciales del anabolismo óseo como *SPP1*, *RUNX2* y *BMP2* (Figura 8A-C).

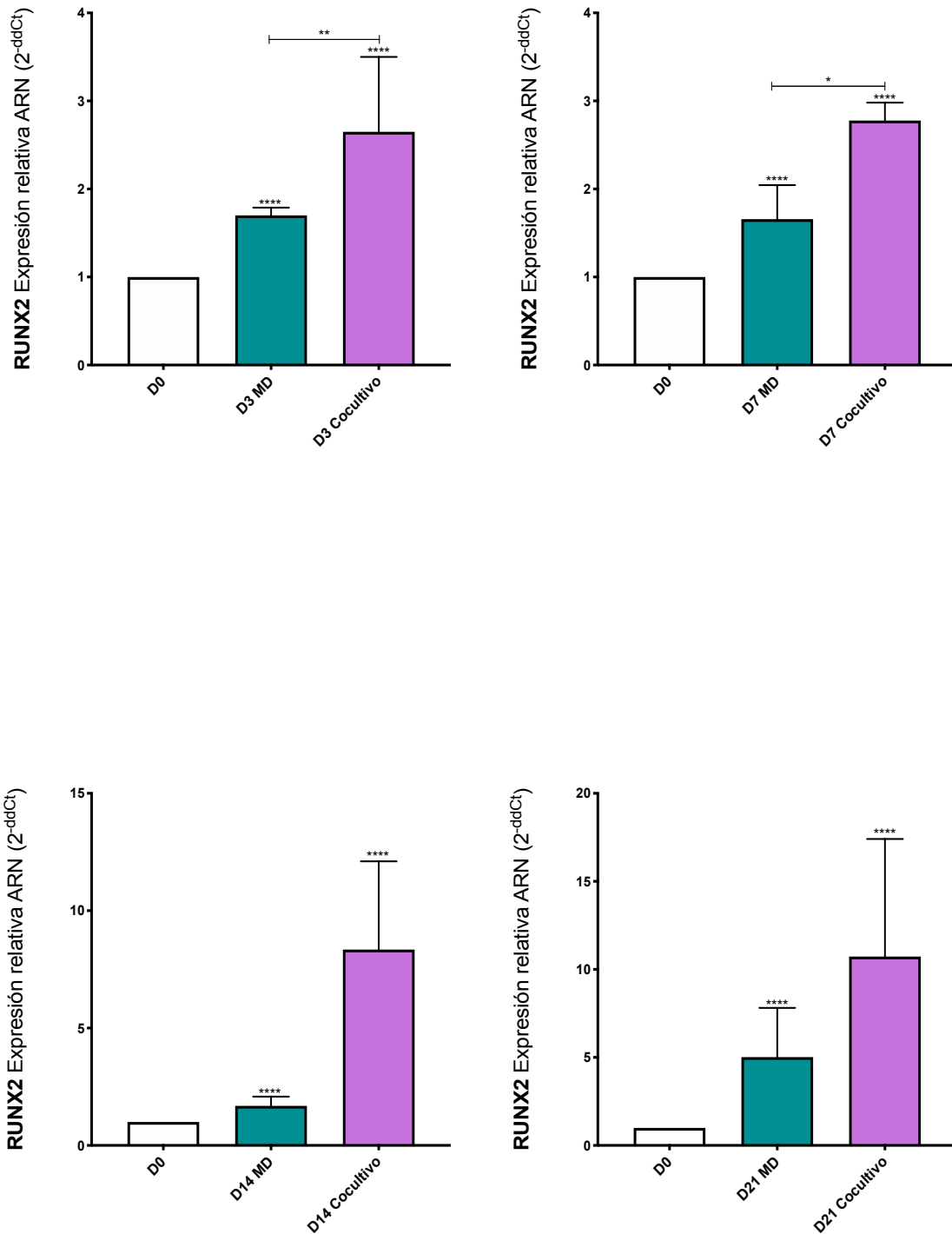
A



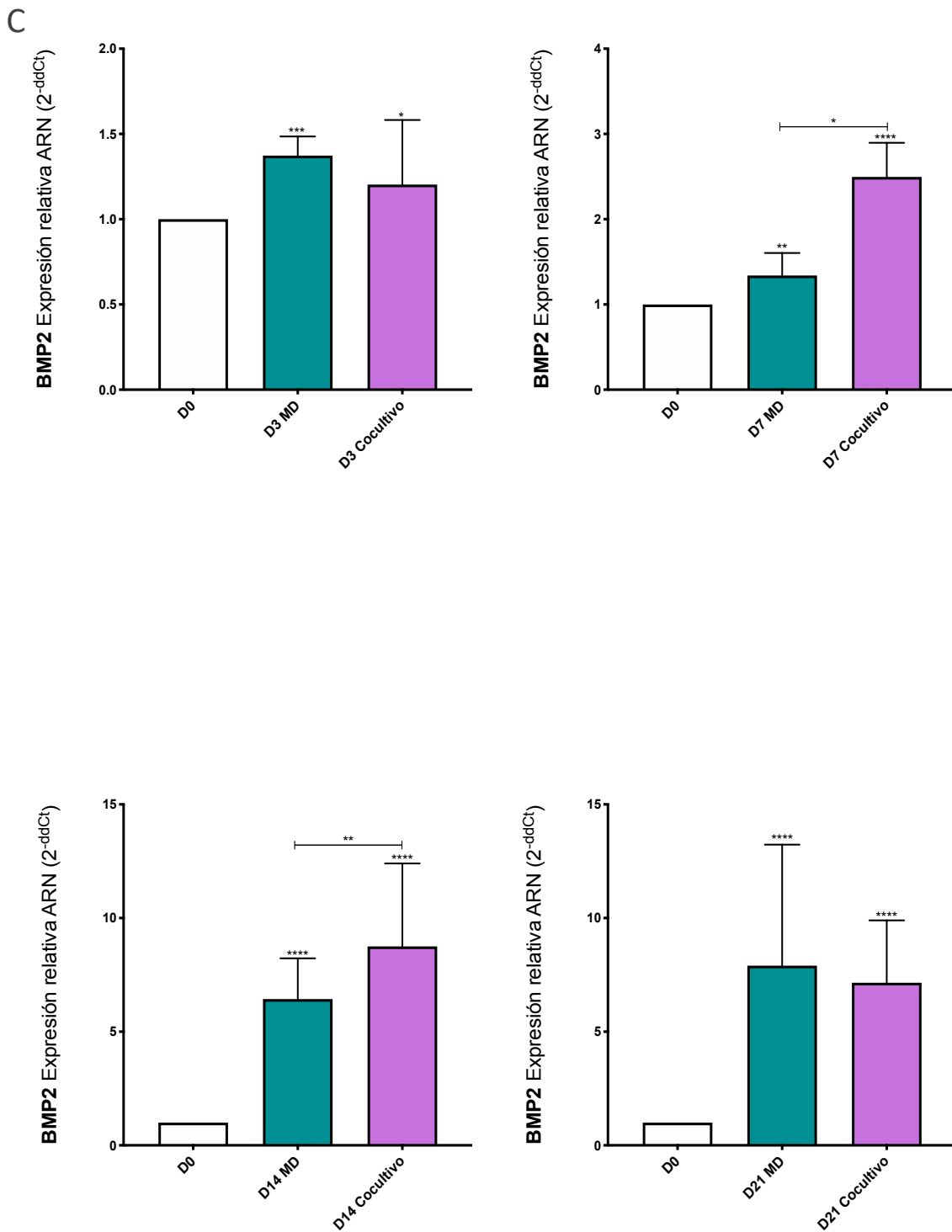
**Figura 8. Impacto del cocultivo de astrocitos-osteoblastos en la osteoblastogénesis.**

A) Expresión del marcador de diferenciación osteoblastogénica *SPP1* medida mediante RT-PCR tras veintidós días de cocultivo celular de astrocitos y osteoblastos.

B



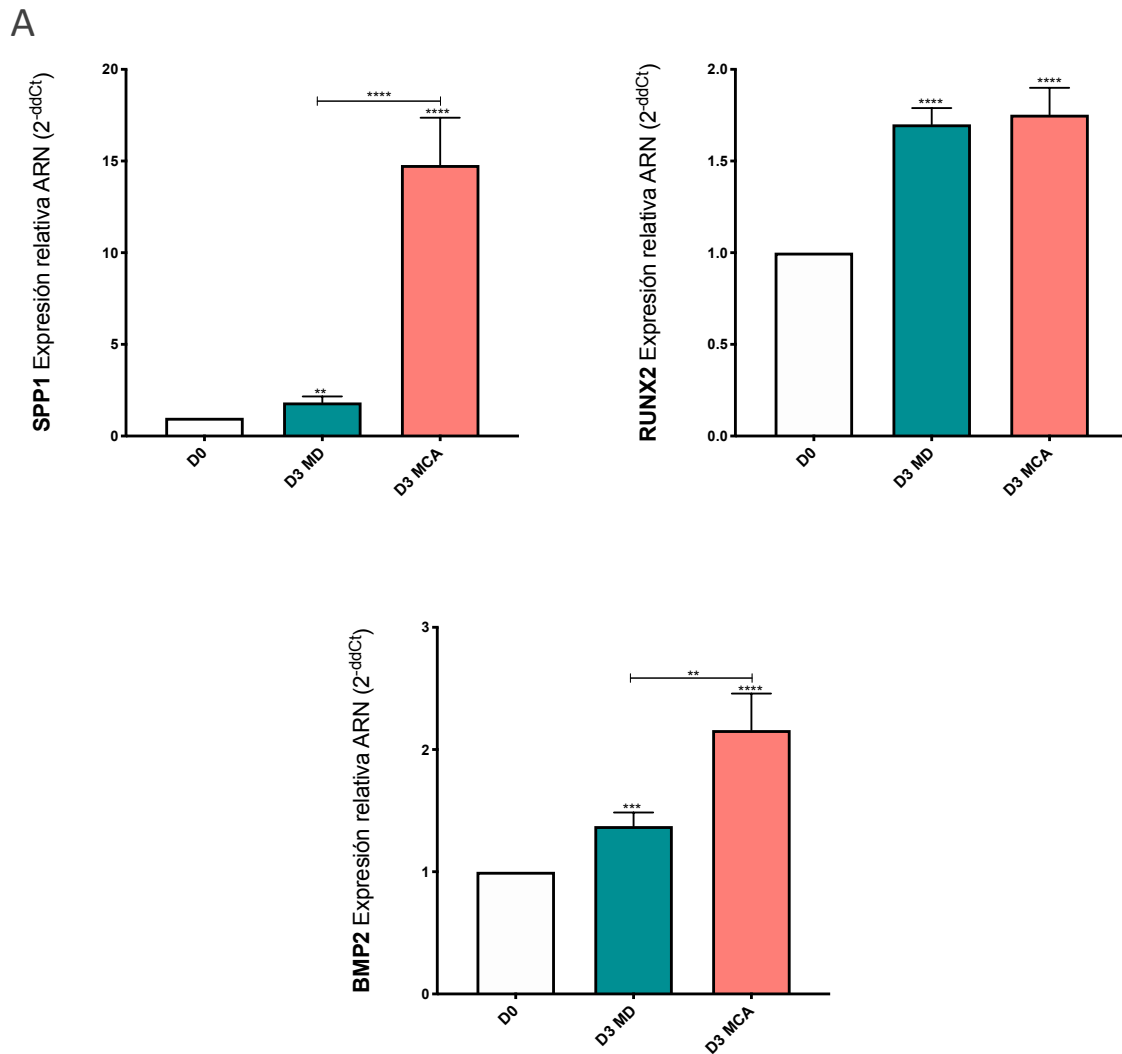
**Figura 8. Impacto del cocultivo de astrocitos-osteoblastos en la osteoblastogénesis (continuación).** B) Expresión del marcador de diferenciación osteoblastogénica *RUNX2* medida mediante RT-PCR tras veintiún días de cocultivo celular de astrocitos y osteoblastos.



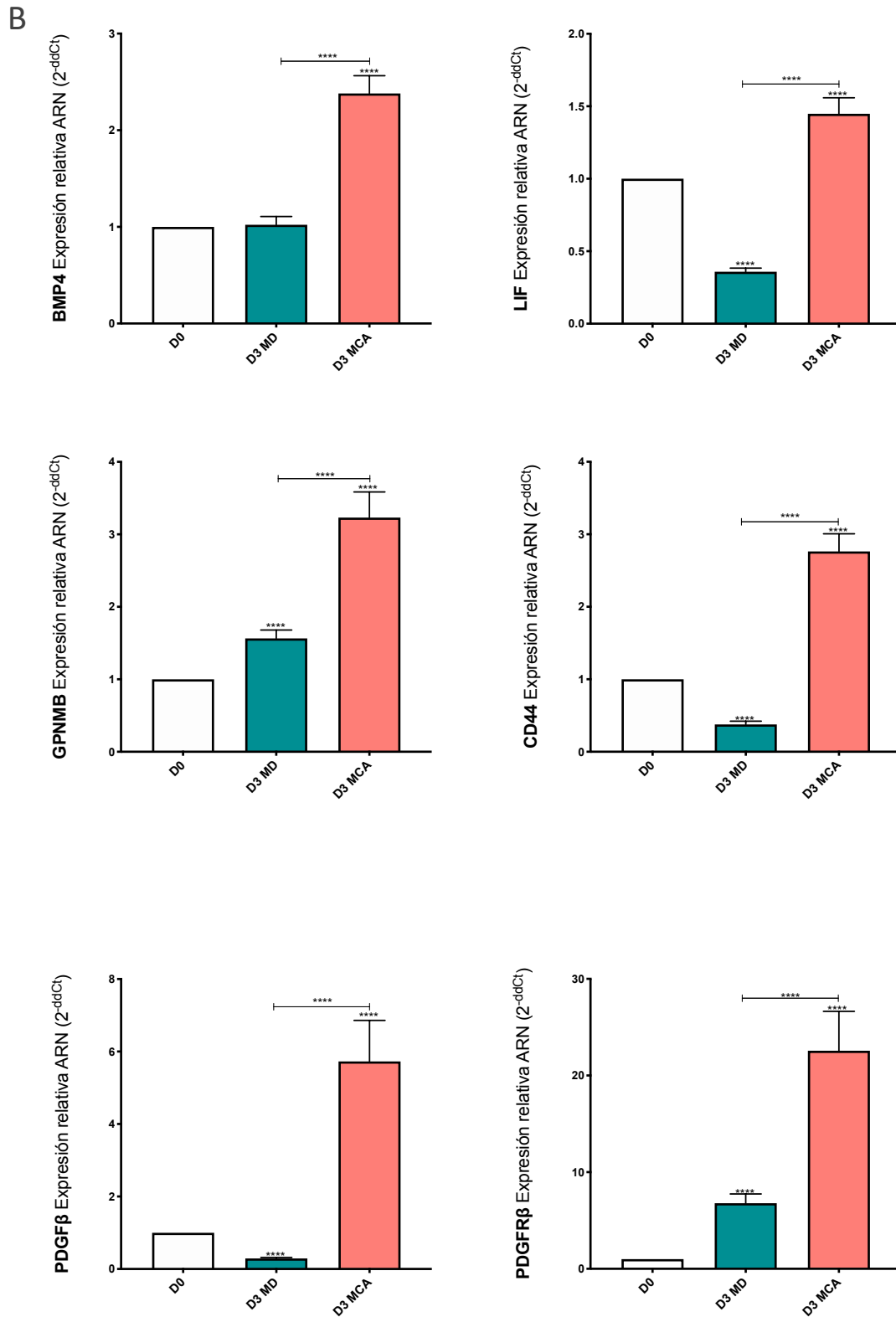
**Figura 8. Impacto del cocultivo de astrocitos-osteoblastos en la osteoblastogénesis (continuación).** C) Expresión del marcador de diferenciación osteoblastogénica *BMP2* medida mediante RT-PCR tras veintiún días de cocultivo celular de astrocitos y osteoblastos.

Para determinar si este efecto fue debido al efecto directo de los astrocitos sobre los osteoblastos, o si por el contrario se trataba de un efecto producto de la retroalimentación entre ambos tipos celulares, se dejó que los astrocitos condicionasen el MD durante tres días para obtener el MCA. Posteriormente, se estimularon los osteoblastos con el MCA y se diferenciaron durante tres días. Los efectos anabólicos previamente observados en el cocultivo celular se preservaron, a excepción del efecto sobre *RUNX2*, el cual no se modificó con la presencia del MCA (Figura 9A), lo cual sugiere la liberación de factores anabólicos por parte de los astrocitos. En base a estos hallazgos, se procedió con el estudio de un mayor número de genes relacionados con el metabolismo óseo. Los resultados obtenidos evidenciaron la capacidad del MCA para incrementar en los osteoblastos la expresión génica de los marcadores del anabolismo óseo *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFβ* y su receptor *PDGFRβ* (Figura 9B), así como *OPG* (Figura 9C). Sin embargo, el MCA no indujo cambios en la expresión de *RANKL*, lo cual resultó en una reducción del ratio de remodelado óseo *RANKL/OPG* (Figura 9C).

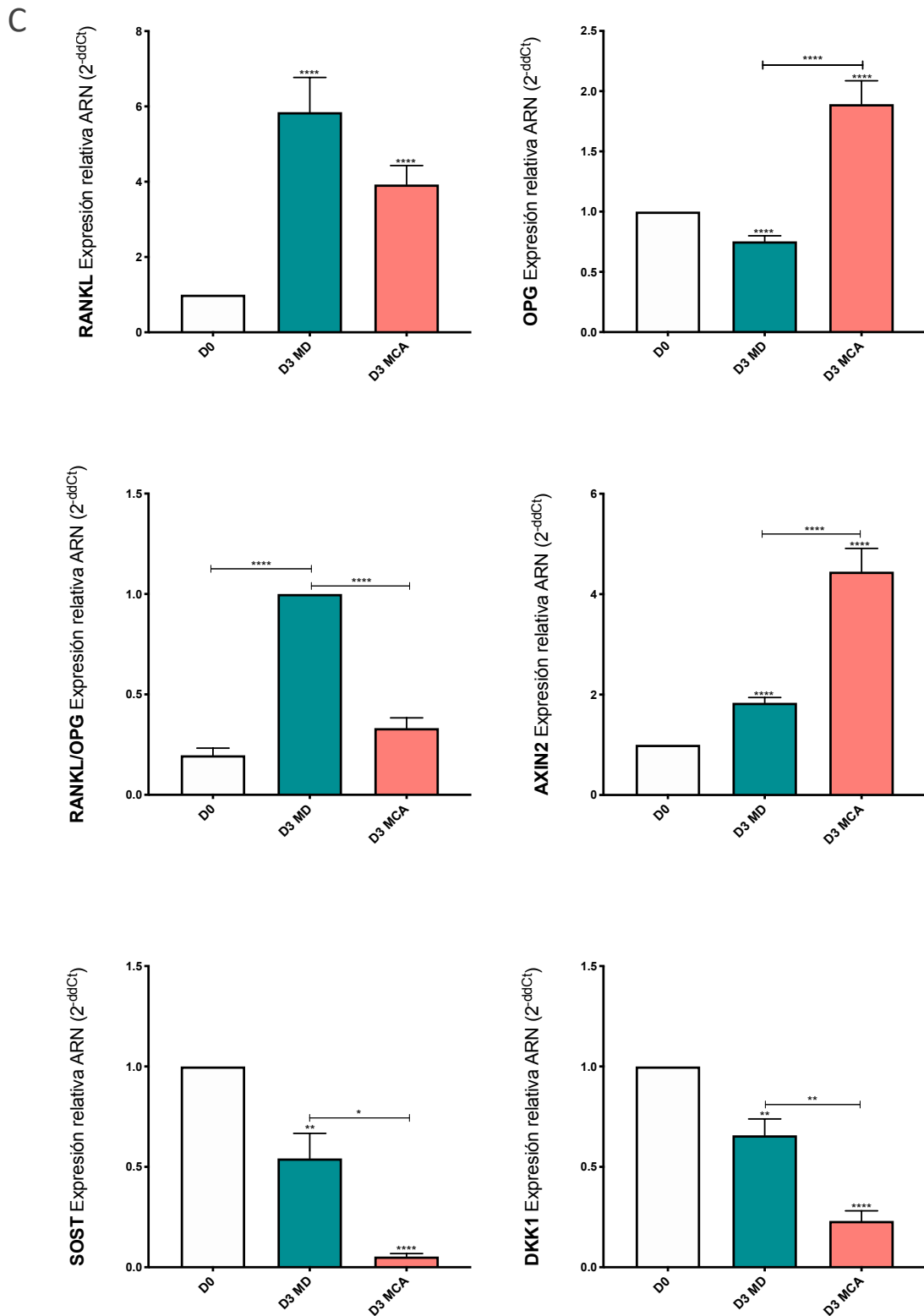
Finalmente, la presencia del MCA moduló los principales marcadores génicos de la vía *WNT*. Así, el estímulo del MCA incrementó la expresión génica de *AXIN2* en los osteoblastos, gen inducible tras la activación de la vía *WNT*, que a su vez actúa como un inhibidor de la misma mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (89); y disminuyó la expresión génica de *SOST* y *DKK1*, principales inhibidores de esta vía (Figura 9C) (36–39).



**Figura 9. Efecto del MCA sobre el anabolismo óseo en el proceso de osteoblastogénesis.** A) Expresión de los marcadores de diferenciación osteoblastogénica *SPP1*, *RUNX2* y *BMP2* medida mediante RT-PCR en SaOS2 estimuladas con el MCA diferenciadas a osteoblasto durante tres días.



**Figura 9. Efecto del MCA sobre el anabolismo óseo en el proceso de osteoblastogénesis (continuación).** B) Cuantificación mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFβ* y *PDGFRβ* durante la diferenciación de las SaOS2 en presencia o ausencia del MCA durante tres días.

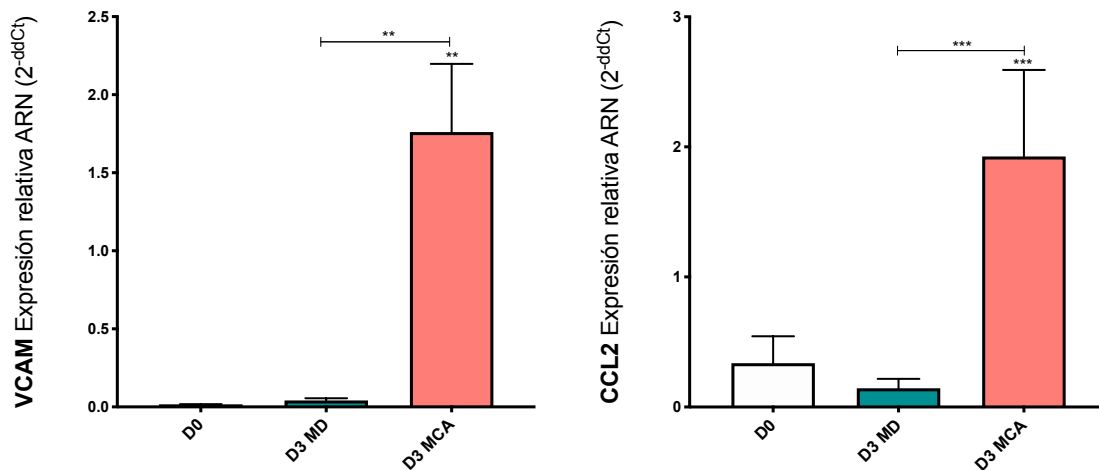


**Figura 9. Efecto del MCA sobre el anabolismo óseo en el proceso de osteoblastogénesis (continuación).** C) Cuantificación mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *RANKL*, *OPG*, ratio *RANKL/OPG*, y los genes relacionados con la vía *WNT* *AXIN2*, *SOST*, *DKK1* durante la diferenciación de las SaOS2 en presencia o ausencia del MCA durante tres días.



## 1.2. Determinación del efecto inflamatorio del medio condicionado por los astrocitos sobre los osteoblastos

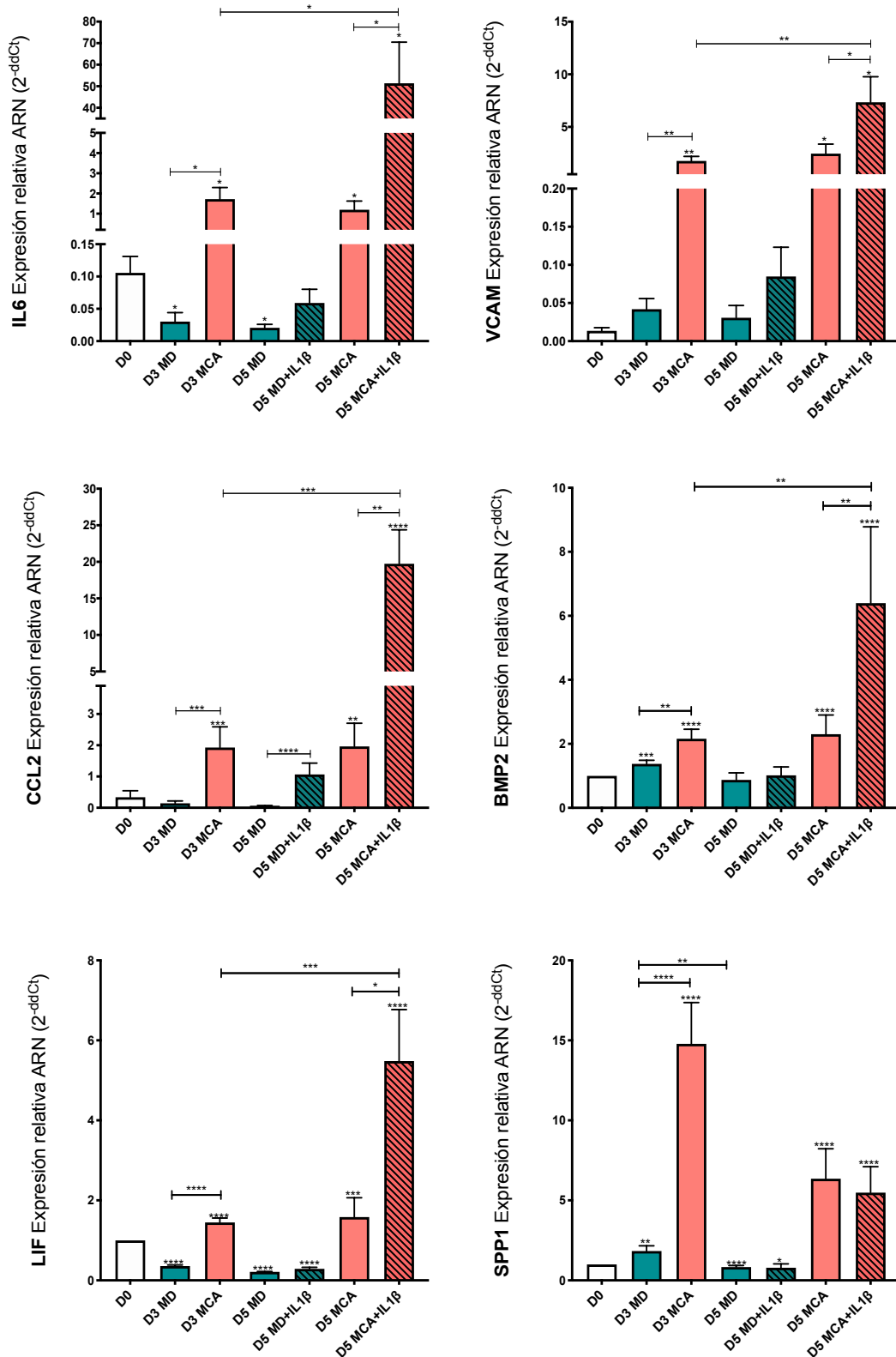
Considerando el papel de la inflamación en el anabolismo óseo (35,48,57), se investigó la capacidad del MCA para modular los procesos inflamatorios en los osteoblastos. El MCA incrementó la expresión génica de marcadores inflamatorios relevantes como *VCAM*, gen relacionado con el reclutamiento leucocitario y la adhesión vascular asociada a la inflamación; y *CCL2*, gen promotor de la quimiotaxis de monocitos y polarización de macrófagos en procesos inflamatorios, en las SaOS2 diferenciadas a osteoblastos durante tres días (Figura 10).



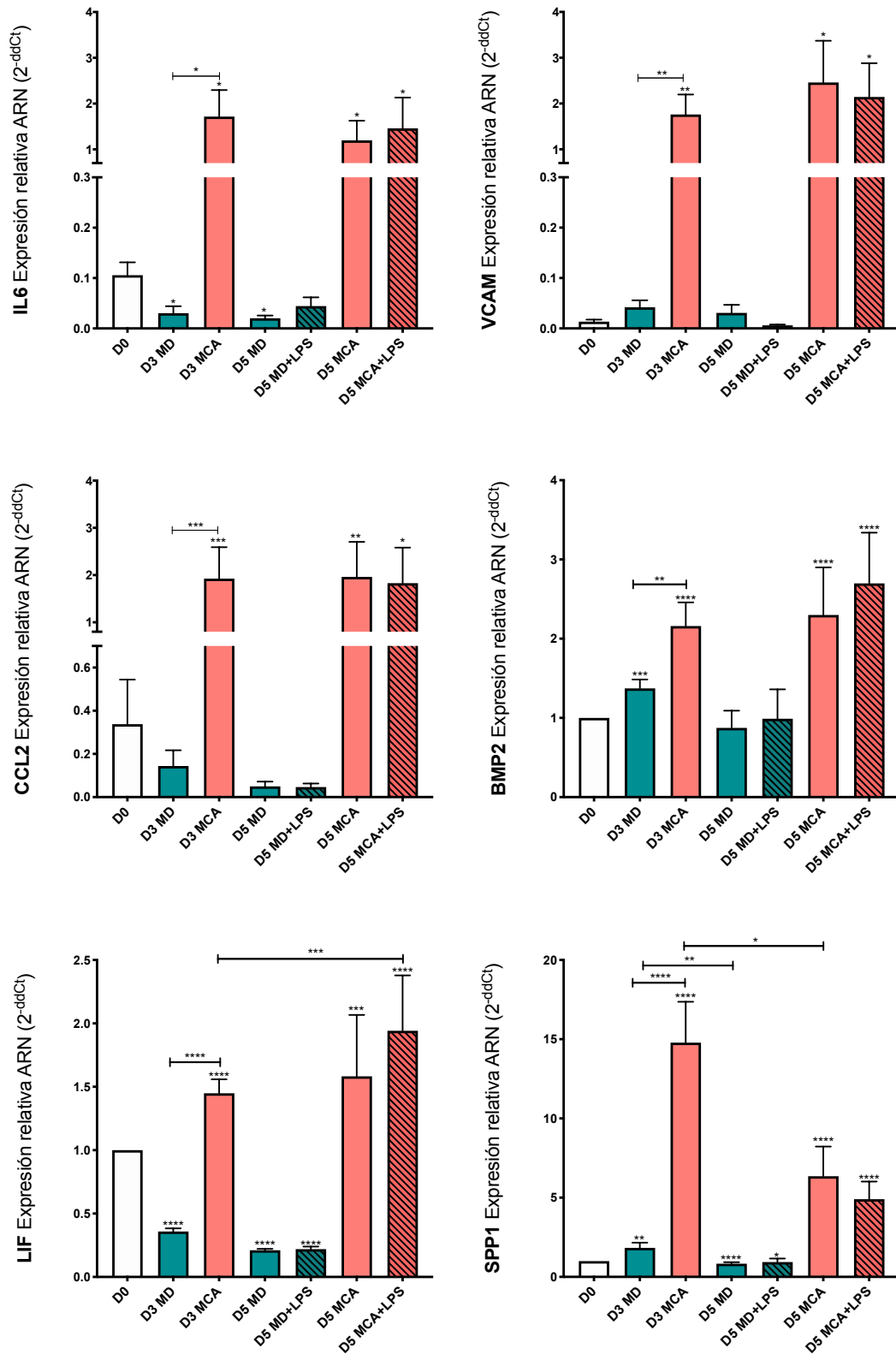
**Figura 10. Efecto del MCA sobre el perfil inflamatorio en la osteoblastogénesis.** Expresión medida por RT-PCR de los marcadores inflamatorios *VCAM* y *CCL2* en osteoblastos diferenciados durante tres días en presencia y ausencia del MCA.

Con la finalidad de estudiar la contribución del efecto inflamatorio intrínseco del MCA a las respuestas inflamatorias asociadas a las respuestas inmunes innatas que se han descrito en la OHN, las células SaOS2 fueron estimuladas con *IL1 $\beta$*  (0,1 ng/mL) y LPS (100 ng/mL) durante 48h, tras ser diferenciadas a osteoblasto en presencia o ausencia del MCA durante tres días. La presencia del MCA potenció el efecto inflamatorio de la *IL1 $\beta$* , lo cual se evidenció mediante el aumento en la expresión génica de *IL6*, *VCAM* y *CCL2* (Figura 11). Interesantemente, el estímulo inflamatorio incrementó la expresión de los genes anabólicos óseos *BMP2* y *LIF* inducidos por el MCA (Figura 11). No obstante, la *IL1 $\beta$*  no modificó la expresión de *SPP1* (Figura 11). En cuanto al LPS, principal agonista del receptor tipo *Toll* 4 (*TLR4*, por sus siglas en inglés), éste no alteró el perfil inflamatorio ni el metabolismo óseo (Figura 12).

## Resultados



**Figura 11. Efecto de la adición de  $IL1\beta$  sobre los efectos basales del MCA en la osteoblastogénesis.** Expresión génica medida mediante RT-PCR de los marcadores inflamatorios y del metabolismo óseo  $IL6$ ,  $VCAM$ ,  $CCL2$ ,  $BMP2$ ,  $LIF$  y  $SPP1$  en células SaOS2 estimuladas con  $IL1\beta$  (0,1 ng/mL) durante 48h, tras ser diferenciadas a osteoblasto en presencia y ausencia el MCA durante tres días.

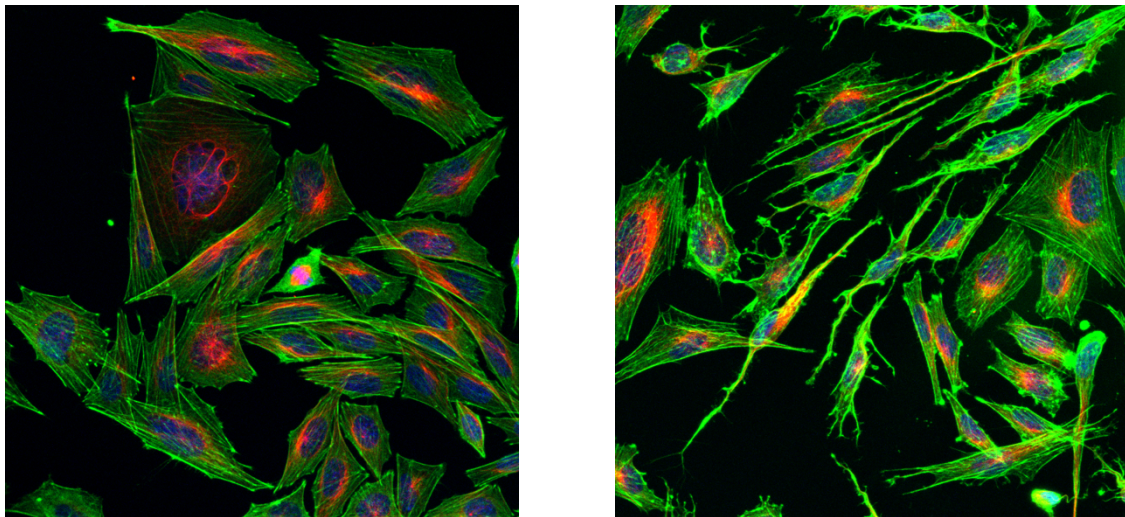


**Figura 12. Efecto de la adición de LPS sobre los efectos basales del MCA en la osteoblastogénesis.** Determinación mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores *IL6*, *VCAM*, *CCL2*, *BMP2*, *LIF* y *SPP1* en osteoblastos estimulados con LPS (100 ng/mL) durante 48h, trascurridos tres días de diferenciación osteoblástica en presencia o ausencia del MCA.

### 1.3. Determinación de los cambios morfológicos celulares inducidos por el medio condicionado por los astrocitos

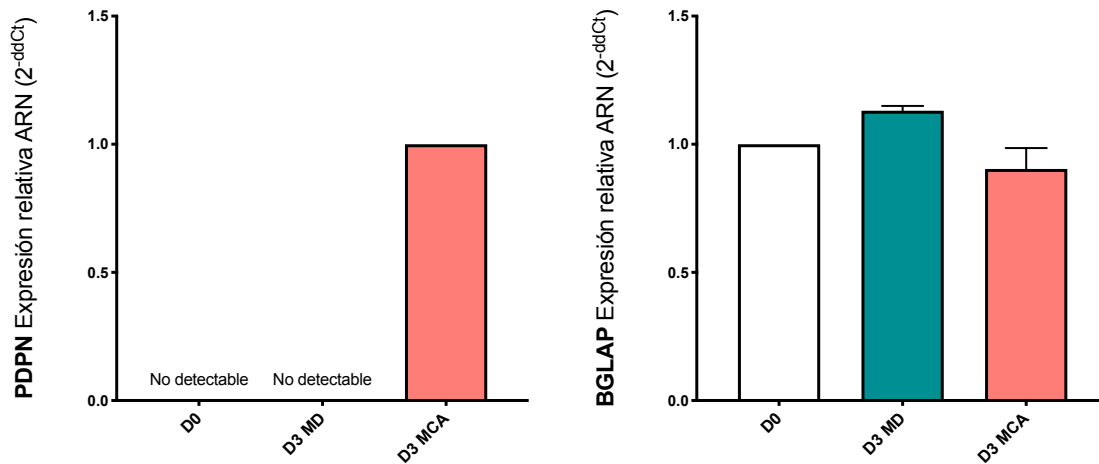
Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de los astrocitos para incrementar la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo en las células SaOS2. Para determinar el efecto del MCA sobre la morfología de los osteoblastos se realizaron tinciones de tubulina, actina y del núcleo celular. Los datos obtenidos pusieron de manifiesto la capacidad del MCA para inducir cambios morfológicos similares a los osteocitos en las SaOS2 (Figura 13A). Teniendo en cuenta estos hallazgos, se estudiaron marcadores de osteocitos en las SaOS2 mediante RT-PCR. En consistencia con los resultados de las tinciones, el MCA incrementó la expresión génica de *PDPN* (Figura 13B), marcador temprano de la diferenciación del osteoblasto a osteocito. Sin embargo, el MCA no modificó *BGLAP*, el otro marcador de osteocito estudiado (Figura 13B).

A



**Figura 13. Cambios morfológicos producidos por el MCA sobre los osteoblastos. A)** Tinción de tubulina, actina y núcleo celular en células SaOS2 diferenciadas durante tres días en presencia y ausencia del MCA.

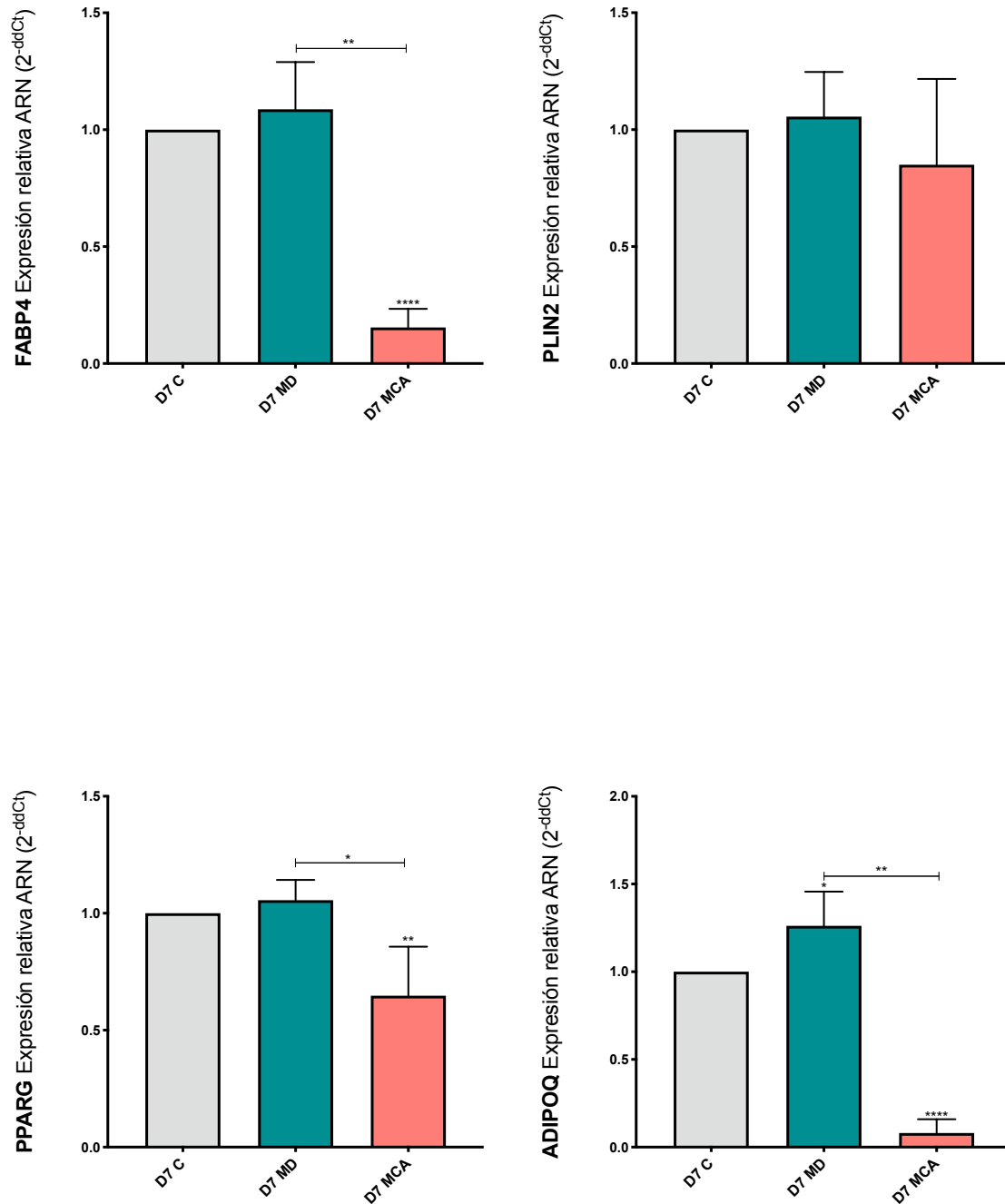
B



**Figura 13. Cambios morfológicos producidos por el MCA sobre los osteoblastos (continuación).** B) Expresión génica determinada mediante RT-PCR de los marcadores de osteocitos *PDPN* y *BGLAP* en células SaOS2 diferenciadas a osteoblasto durante tres días en presencia o ausencia del MCA.

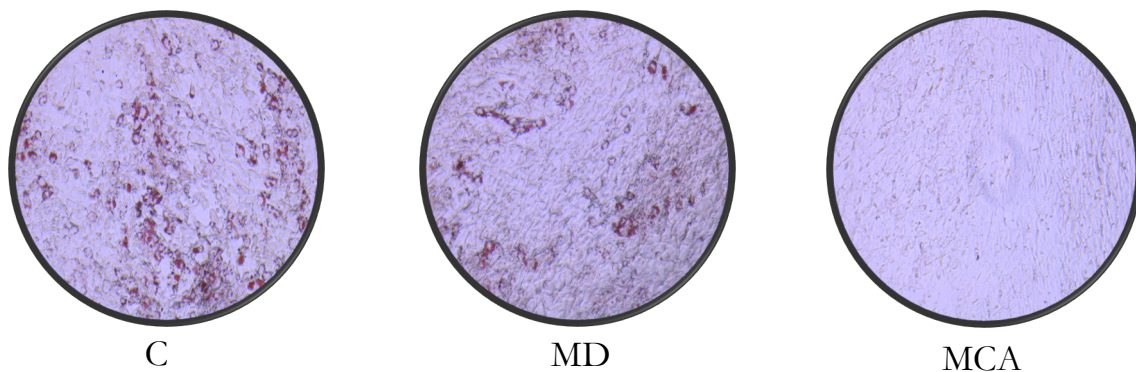
## 2. EFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO POR LOS ASTROCITOS EN LA ADIPOGÉNESIS

Los resultados anteriores apuntaron al MCA como promotor del anabolismo óseo en osteoblastos. Considerando que los osteoblastos y los adipocitos comparten un mismo origen celular, las *MSCs*, y teniendo en cuenta que los procesos de osteoblastogénesis y adipogénesis están en equilibrio y son antitéticos, se realizaron experimentos para testar el efecto del MCA en la diferenciación de las C3H10T1/2 a adipocito durante 7 días. Los datos obtenidos revelaron una disminución en la expresión génica de los marcadores adipogénicos *FABP4*, *PPARG* y *ADIPOQ* (Figura 14) en las células tratadas con el MCA. Sin embargo, el MCA no alteró la expresión de *PLIN2* (Figura 14).



**Figura 14. Efecto del MCA sobre la adipogénesis. Estudio de marcadores adipogénicos.** Expresión génica objetivada mediante RT-PCR de los principales marcadores adipogénicos *FABP4*, *PLIN2*, *PPARG* y *ADIPOQ* en células C3H10T1/T2 diferenciadas a adipocito durante siete días en presencia o ausencia del MCA.

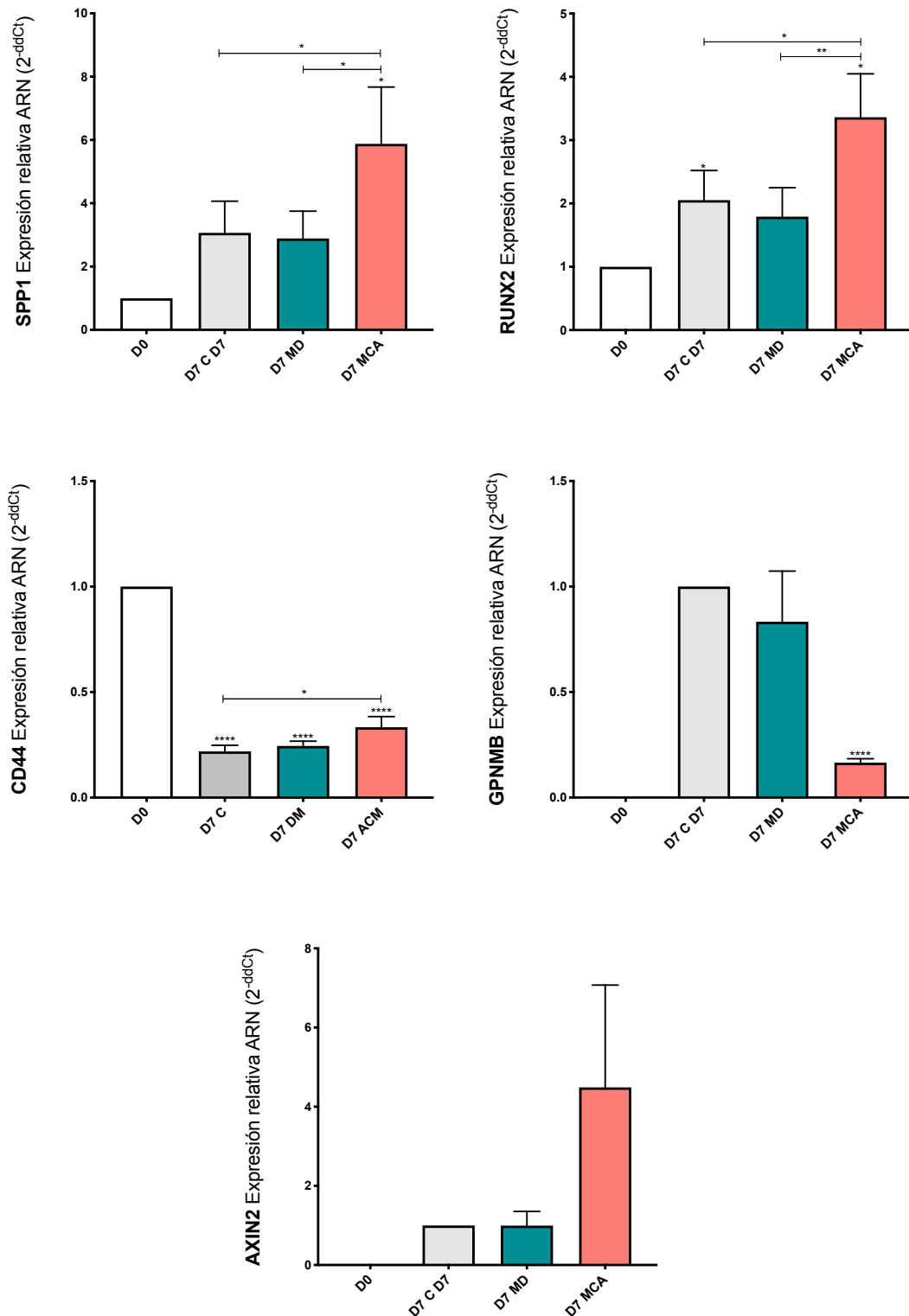
Con el objetivo de validar los datos obtenidos se realizaron tinciones rojo de aceite O en las C3H10T1/2 diferenciadas a adipocito durante 7 días en presencia o ausencia del MCA. Acorde con los datos obtenidos mediante las técnicas de análisis de expresión génica, los depósitos de grasa estaban disminuidos en las condiciones tratadas con el MD, y completamente ausentes en las células estimuladas con el MCA, corroborando de este modo el efecto anti-adipogénico del mismo (Figura 15).



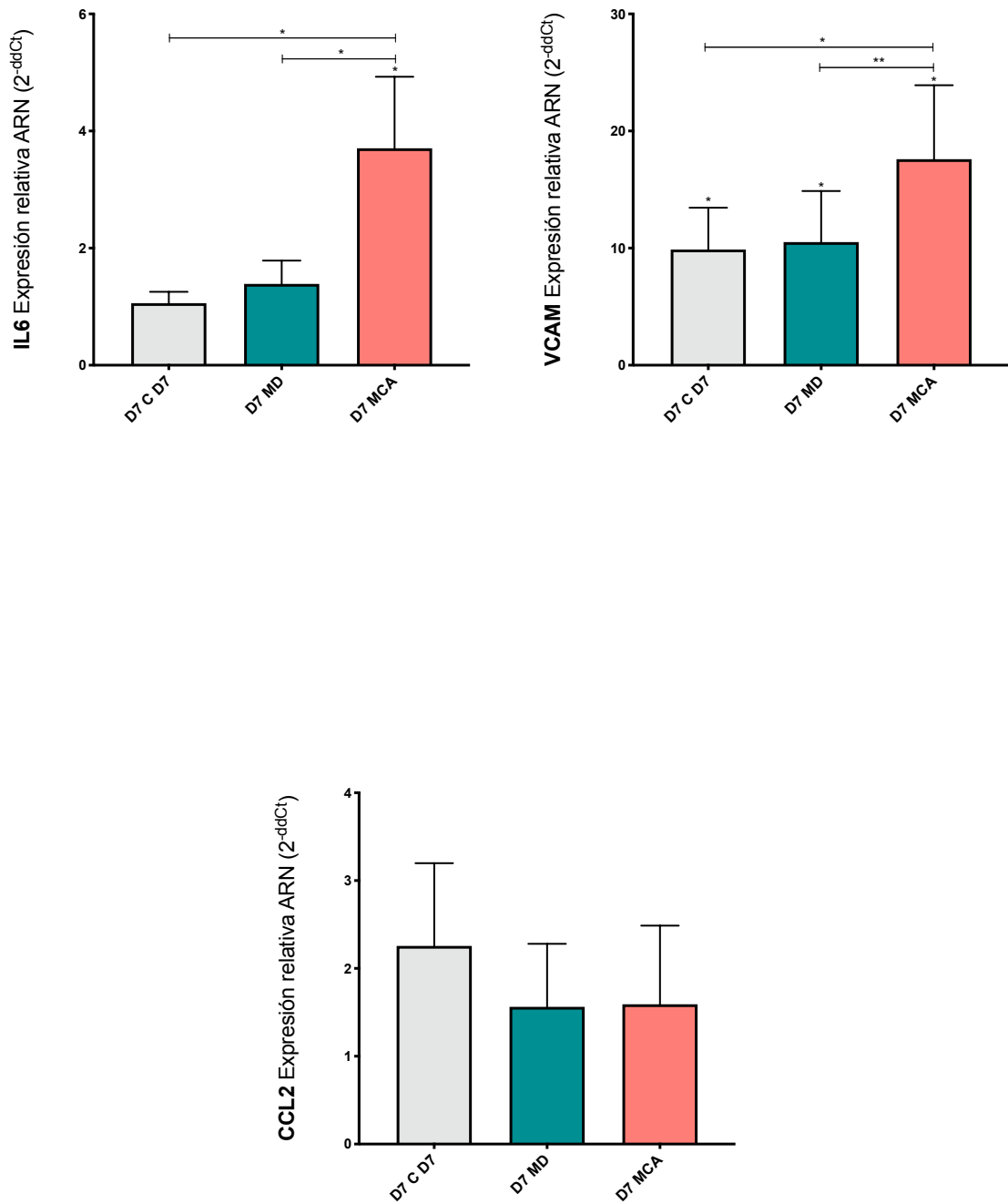
**Figura 15. Efecto del MCA en la acumulación lipídica de células C3H10T1/2 diferenciadas a adipocito.** Tinción de los depósitos lipídicos con rojo de aceite O durante el proceso de diferenciación de las C3H10T1/2 a adipocito durante 7 días en presencia o ausencia del MD y MCA.

Teniendo en cuenta la capacidad de las *MSCs* para diferenciarse tanto a hueso como a grasa, y dado que el MCA actuó como un inhibidor de la adipogénesis, se estudiaron genes relacionados con el metabolismo óseo y con el proceso inflamatorio en las diferenciaciones de C3H10T1/2 a adipocito durante siete días. Interesantemente, el MCA fue capaz de aumentar la expresión génica de los marcadores *SPP1*, *RUNX2*, *CD44*, *AXIN2* (Figura 16), *IL6* y *VCAM* (Figura 17). Por el contrario, este medio redujo la expresión de *GPNMB* (Figura 16) y no modificó la expresión de *CCL2* (Figura 17).

## Resultados

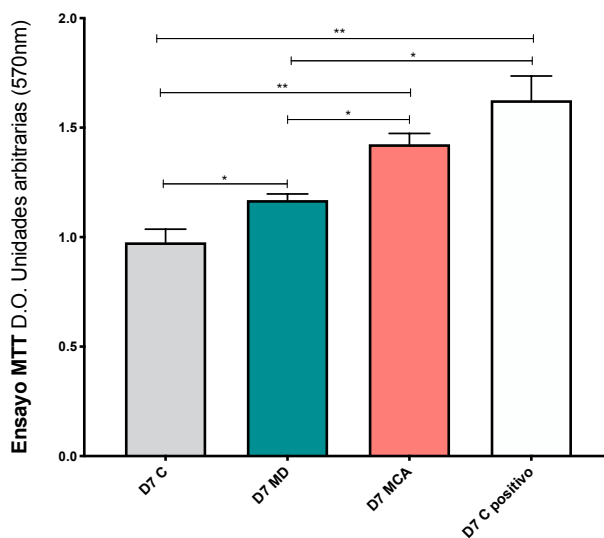


**Figura 16. Efecto del MCA sobre la adipogénesis. Estudio de marcadores relacionados con el metabolismo óseo.** Expresión génica medida mediante RT-PCR de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *SPP1*, *RUNX2*, *CD44*, *GPNMB* y *AXIN2* en las C3H10T1/2 diferenciadas durante siete días en presencia o ausencia del MCA.



**Figura 17. Efecto del MCA sobre la adipogénesis. Estudio de marcadores inflamatorios.** Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores inflamatorios *IL6*, *VCAM* y *CCL2* durante el proceso de adipogénesis en presencia o ausencia del MCA

Finalmente, durante el proceso de diferenciación de estas células se observaron variaciones en la proliferación celular. Para determinar dichos cambios, se realizó un MTT de las C3H10T1/2 diferenciadas a adipocito durante siete días en presencia y ausencia del MCA. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la proliferación celular de las C3H10T1/2 estimuladas con el MCA durante su diferenciación a adipocito (Figura 18).



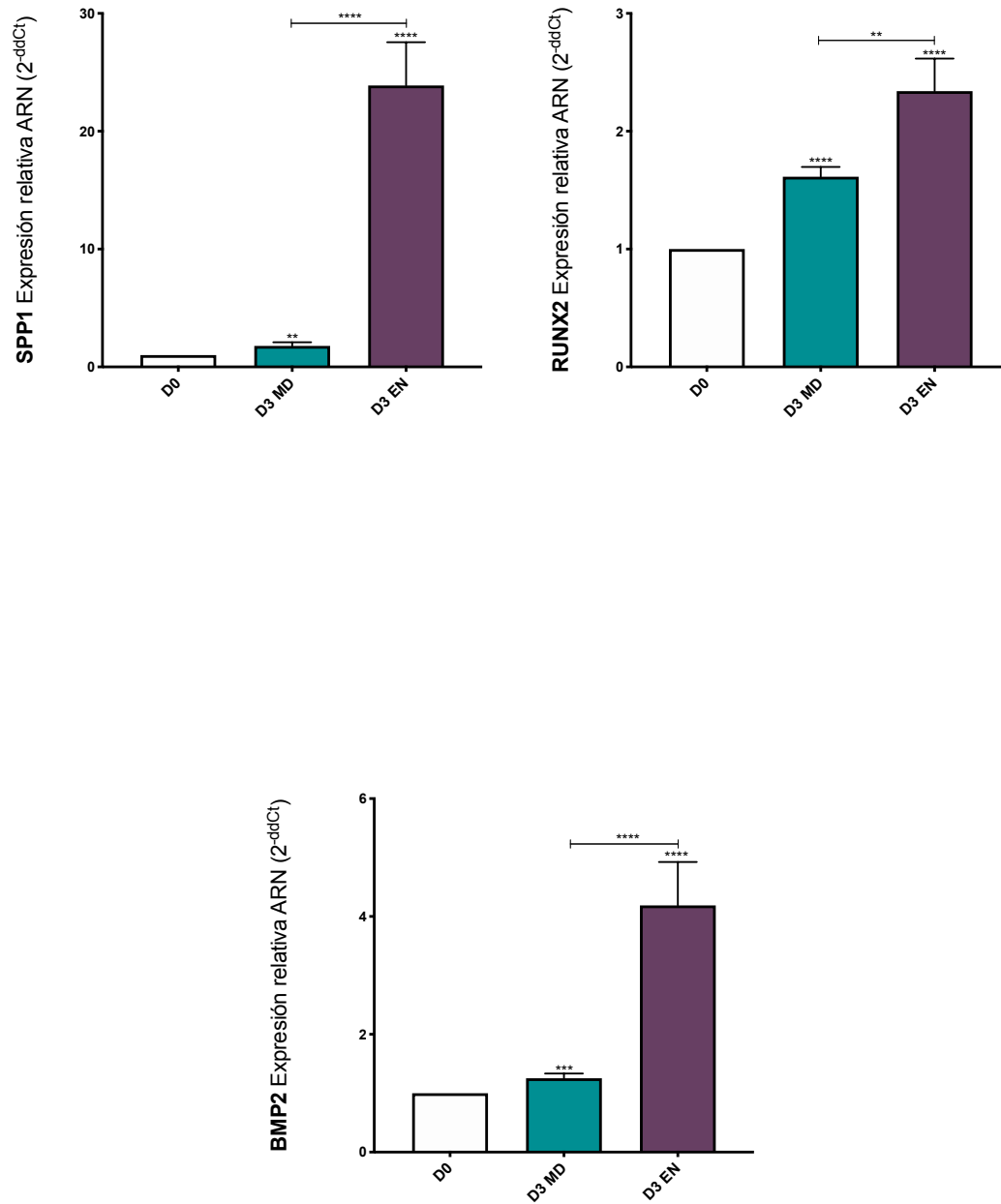
**Figura 18. Efecto del MCA sobre la adipogénesis. Estudio de la viabilidad celular.** Estudio de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT de las C3H10T1/2 diferenciadas a adipocito durante siete días en presencia o ausencia del MCA.

### 3. EFECTO DE LOS EXPLANTES NERVIOSOS EN LA OSTEOLASTOGÉNESIS

La OH es una enfermedad multifactorial cuya etiología permanece a día de hoy desconocida. Sin embargo, existen ciertos factores de riesgo entre los cuales se incluyen haber sufrido un daño neurológico, como por ejemplo un TCE. Recientemente, estudios han señalado la posible implicación del SNP en el desarrollo de la OHN (16,48,52,54,55,57,60,66–68). Con la finalidad de investigar el papel de los nervios periféricos en la formación ectópica de hueso, se cocultivaron EN y SaOS2, y se diferenciaron estas últimas a osteoblastos durante tres días. Los datos obtenidos demostraron un incremento en la expresión génica de los marcadores óseos *SPP1*, *RUNX2*, *BMP2*, *LIF*, *CD44*, *RANKL*, el ratio *RANKL/OPG*, así como un aumento en la expresión de los

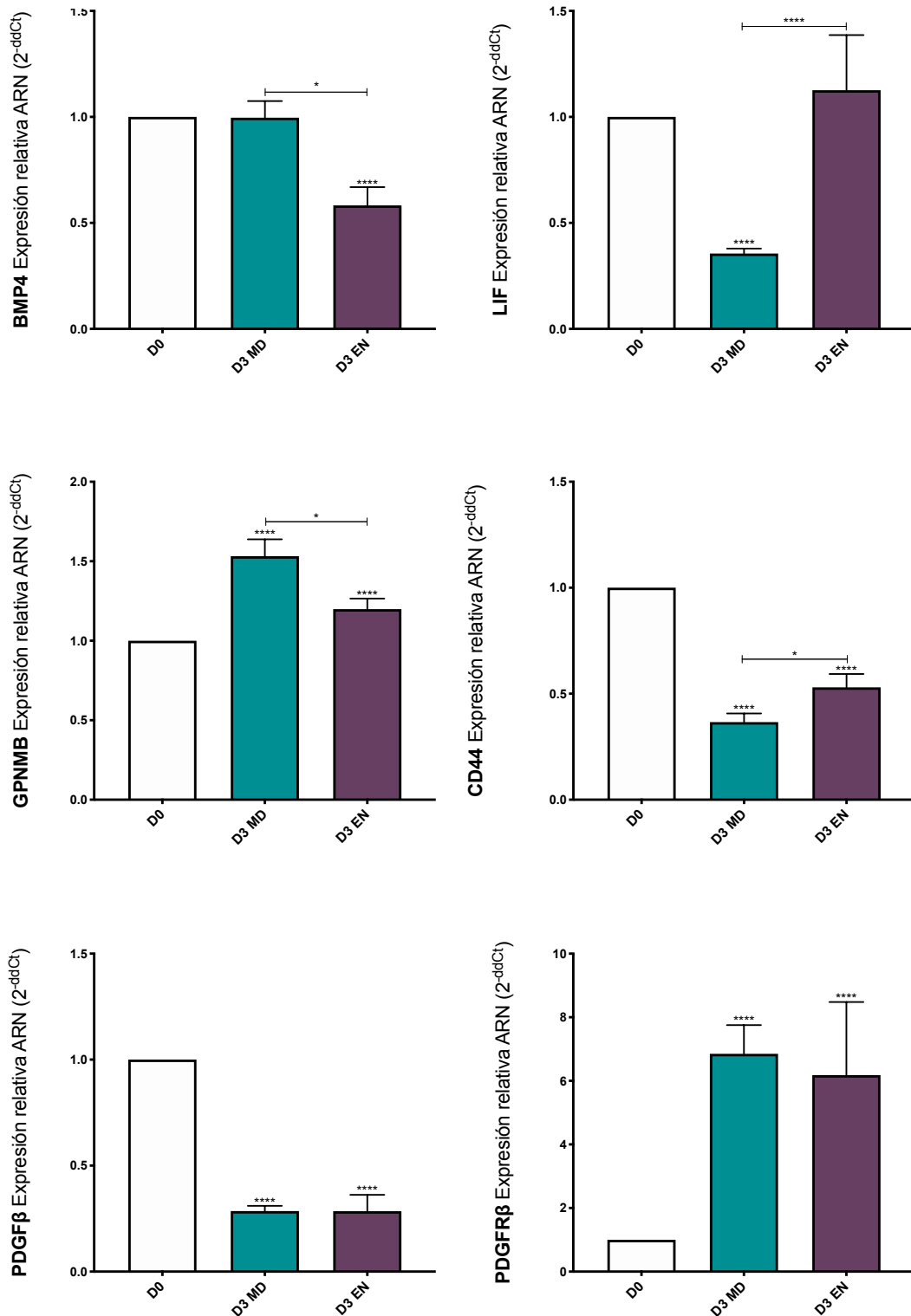
marcadores inflamatorios *VCAM* y *CCL2* en las SaOS2 cocultivadas con los EN (Figura 19A-D). Por el contrario, la coexistencia de los EN y las SaOS2 hicieron disminuir los niveles de expresión de *BMP4* y *GPNMB* (Figura 19B), y no modificaron la expresión de *PDGF $\beta$* , *PDGFR $\beta$* , *OPG* y *AXIN2* (Figura 19B-C).

A



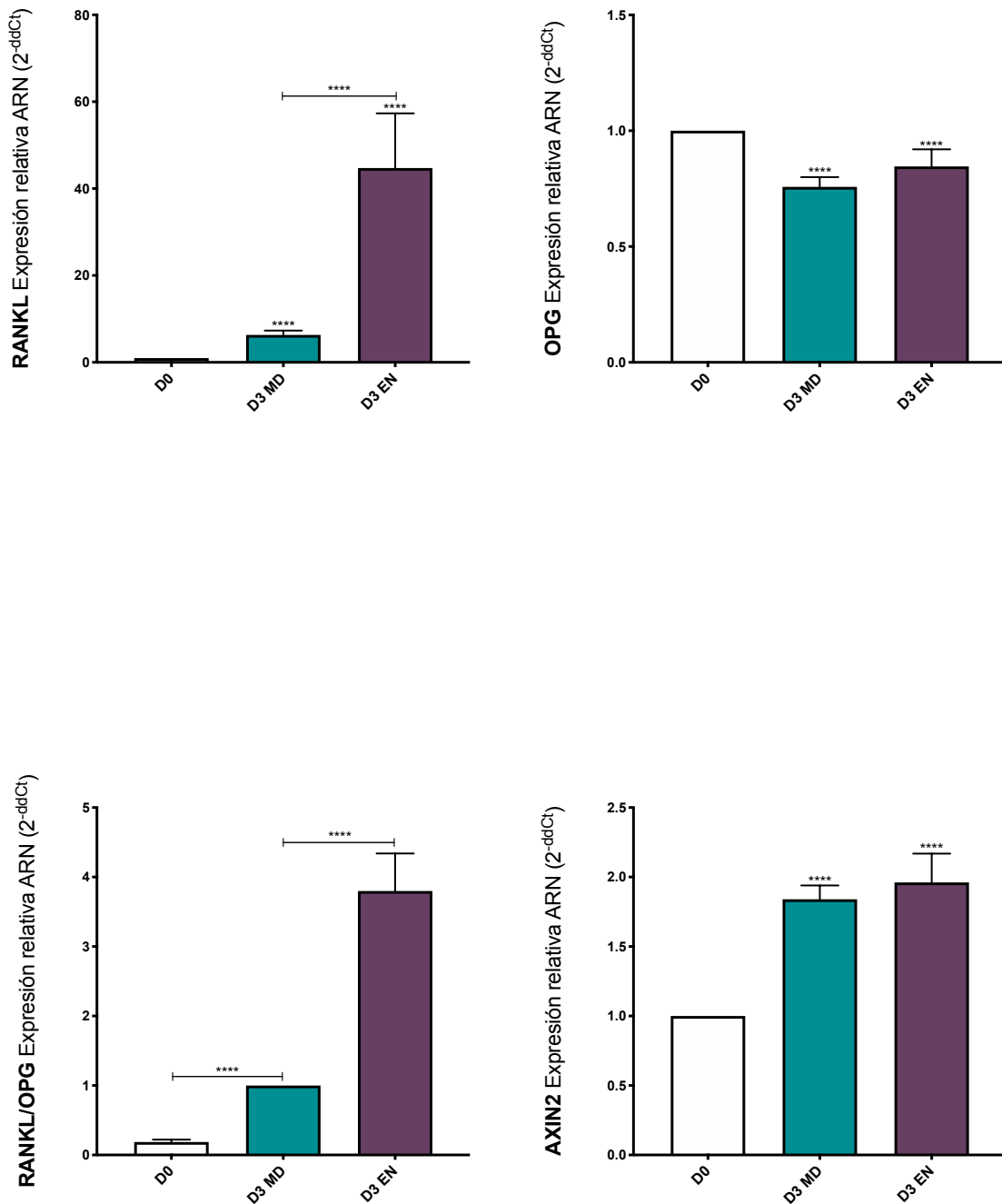
**Figura 19. Efecto de los EN en la osteoblastogénesis.** A) Expresión génica medida mediante RT-PCR de los marcadores de diferenciación osteoblástica *SPP1*, *RUNX2* y *BMP2* tras tres días diferenciación a osteoblasto del cocultivo EN-SaOS2.

B



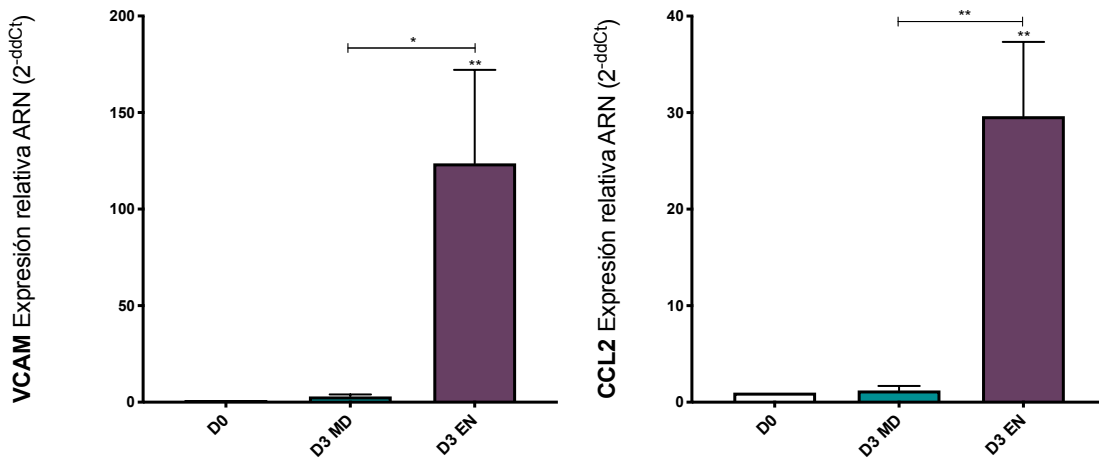
**Figura 19. Efecto de los EN en la osteoblastogénesis (continuación).** B) Determinación mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFβ* y *PDGFRβ* durante la diferenciación de las SaOS2 en presencia o ausencia de los EN durante tres días.

C



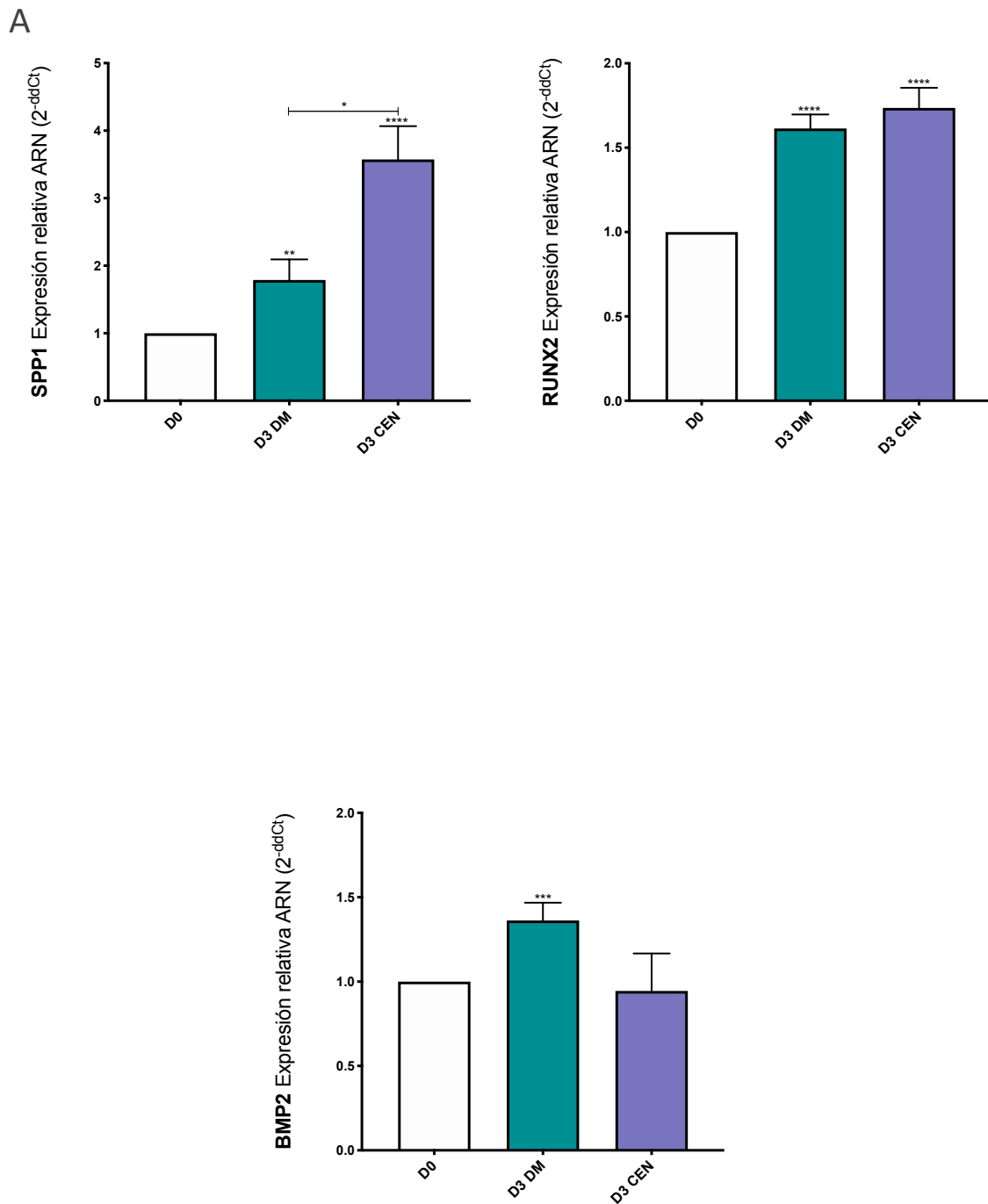
**Figura 19. Efecto de los EN en la osteoblastogénesis (continuación).** C) Determinación mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *RANKL*, *OPG*, ratio *RANKL/OPG* y *AXIN2* durante la diferenciación de las SaOS2 en presencia o ausencia de los EN durante tres días.

D



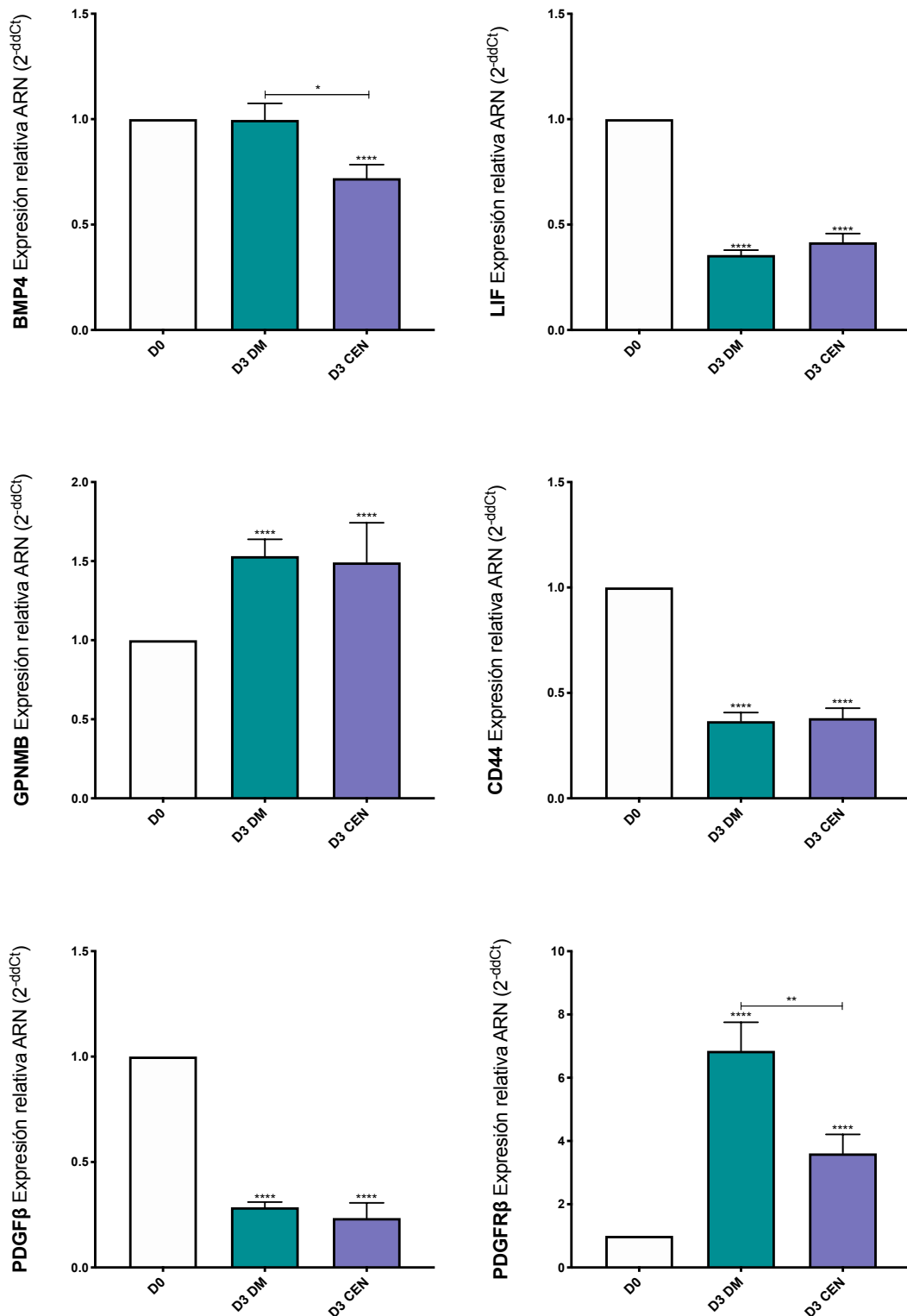
**Figura 19. Efecto de los EN en la osteoblastogénesis** (continuación). D) Expresión génica medida mediante RT-PCR de los marcadores inflamatorios *VCAM* y *CCL2* durante la diferenciación osteoblástica de las SaOS2 en presencia o ausencia de los EN durante tres días.

Paralelamente, se cocultivaron las CEN y las SaOS2 y se diferenciaron a osteoblastos durante tres días. A pesar de que los efectos observados fueron ligeramente más tenues comparados con los cocultivos de los EN y las SaOS2, las CEN fueron capaces de incrementar la expresión génica de *SPP1* y *VCAM* en las células SaOS2. Asimismo, la presencia de las CEN incrementó el ratio *RANKL/OPG* y disminuyó la expresión de *BMP4* y *PDGFR $\beta$* . Sin embargo, este cocultivo no indujo cambios en los demás genes estudiados (Figura 20).

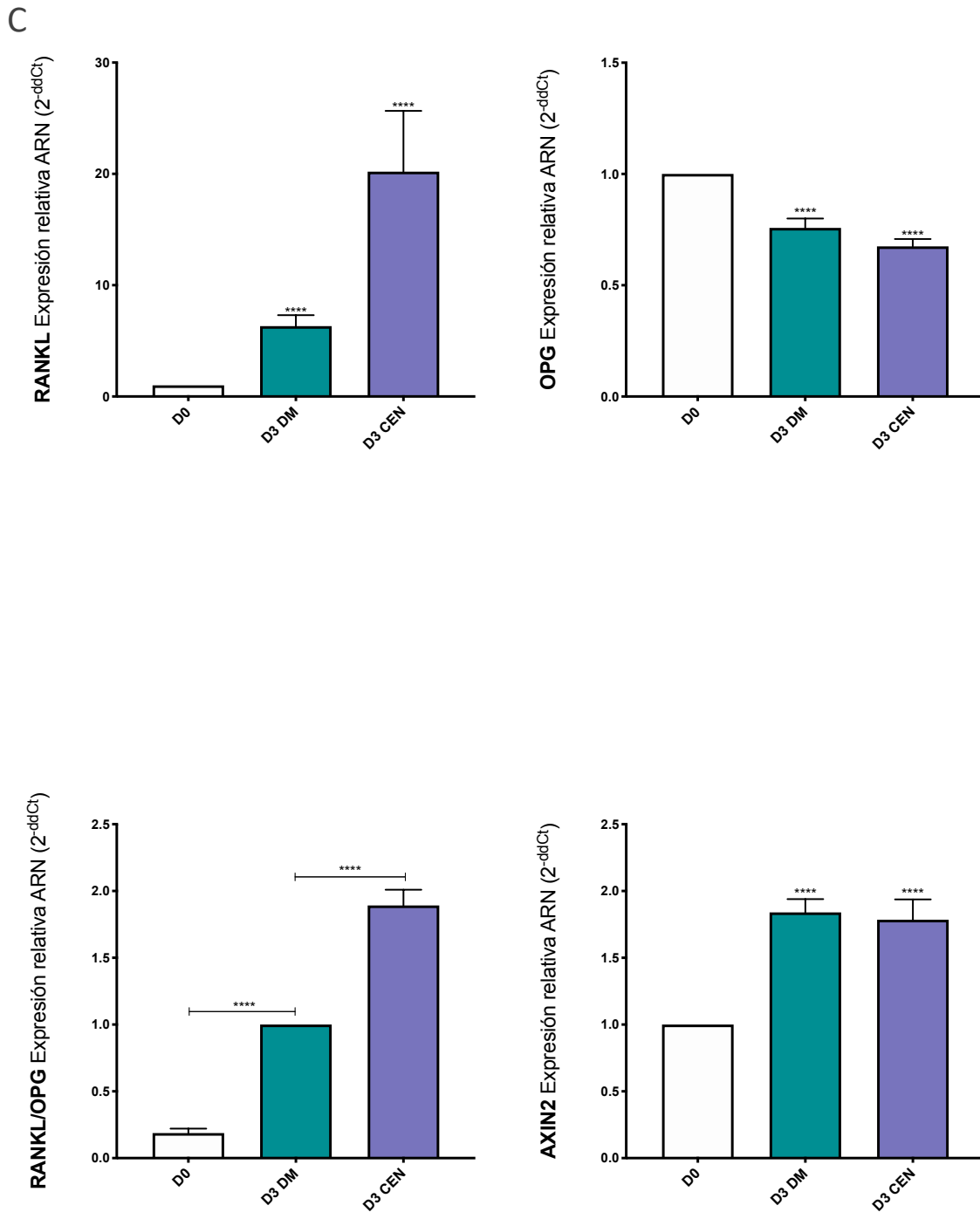


**Figura 20. Efecto de las CEN en la osteoblastogénesis.** A) Cuantificación mediante RT-PCR de la expresión génica de *SPP1*, *RUNX2* y *BMP2* en las SaOS2 diferenciadas durante tres días en presencia o ausencia de las CEN.

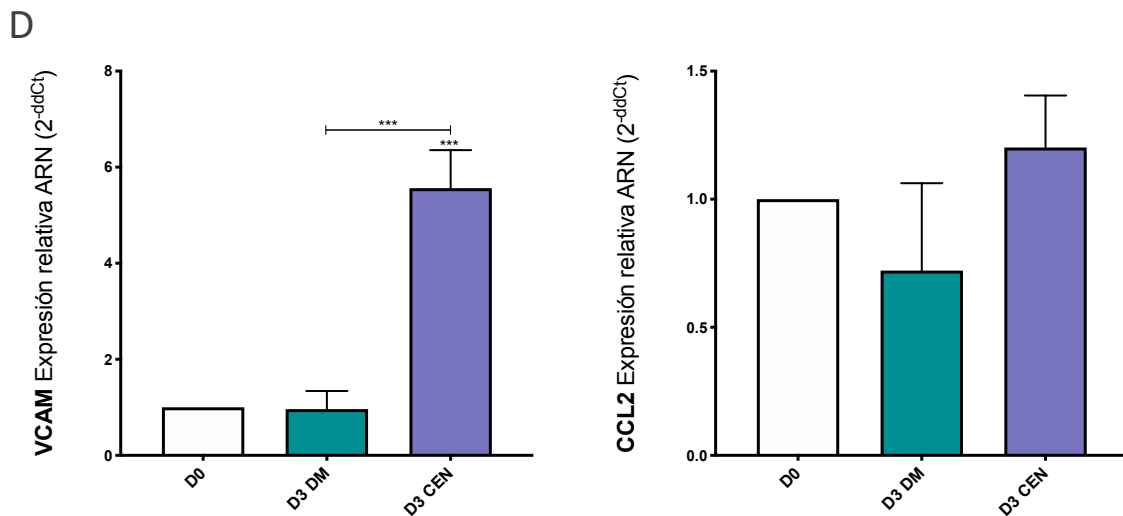
B



**Figura 20. Efecto de las CEN en la osteoblastogénesis (continuación).** B) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo e inflamatorio *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFB* y *PDGFRB* en células SaOS2 diferenciadas durante tres días a osteoblasto en presencia o ausencia de las CEN.



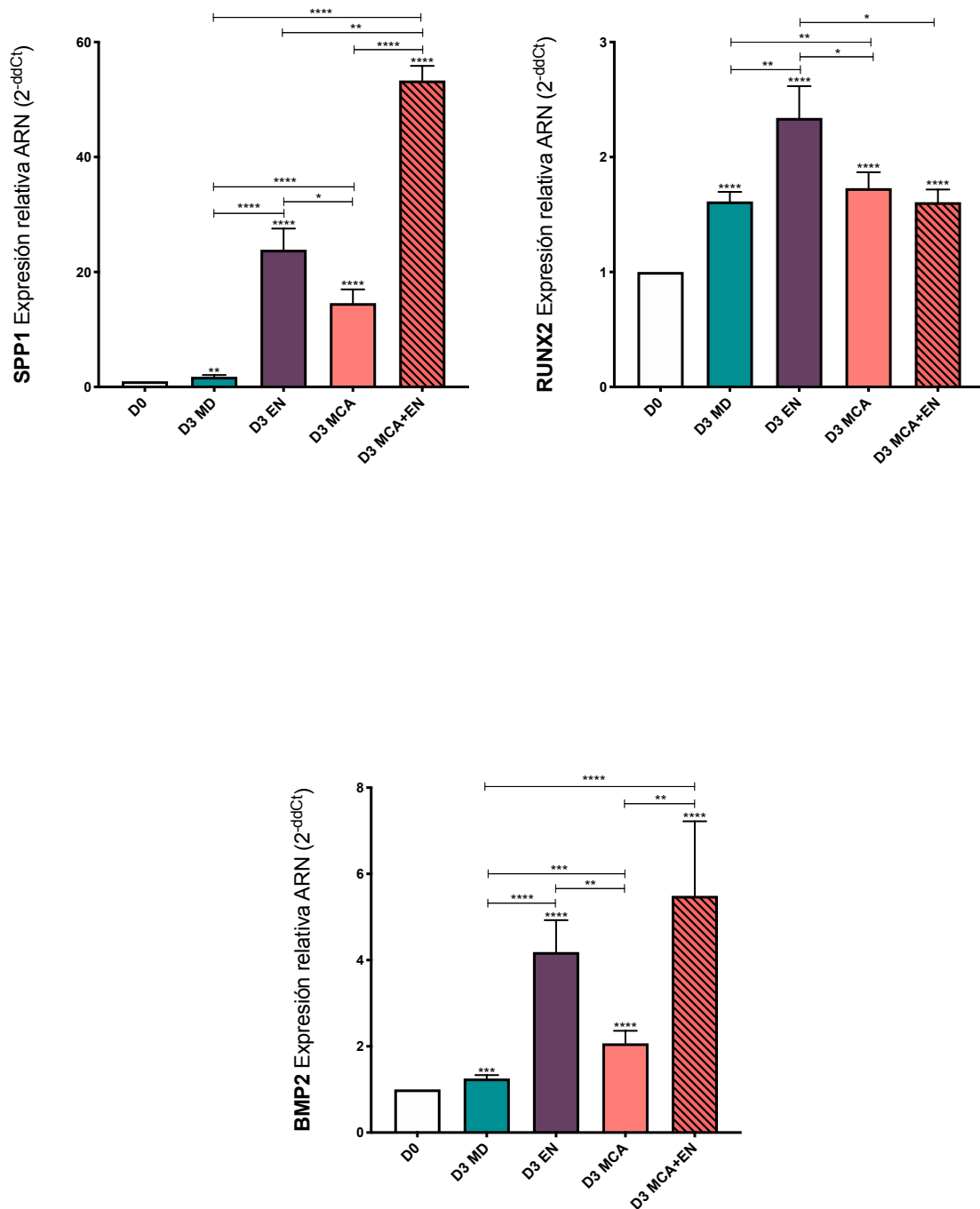
**Figura 20. Efecto de las CEN en la osteoblastogénesis (continuación).** C) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *RANKL*, *OPG*, ratio *RANKL/OPG* y *AXIN2* en células SaOS2 diferenciadas durante tres días a osteoblasto en presencia o ausencia de las CEN.



**Figura 20. Efecto de las CEN en la osteoblastogénesis** (continuación). D) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores inflamatorios *VCAM* y *CCL2* en células SaOS2 diferenciadas durante tres días a osteoblasto en presencia o ausencia de las CEN.

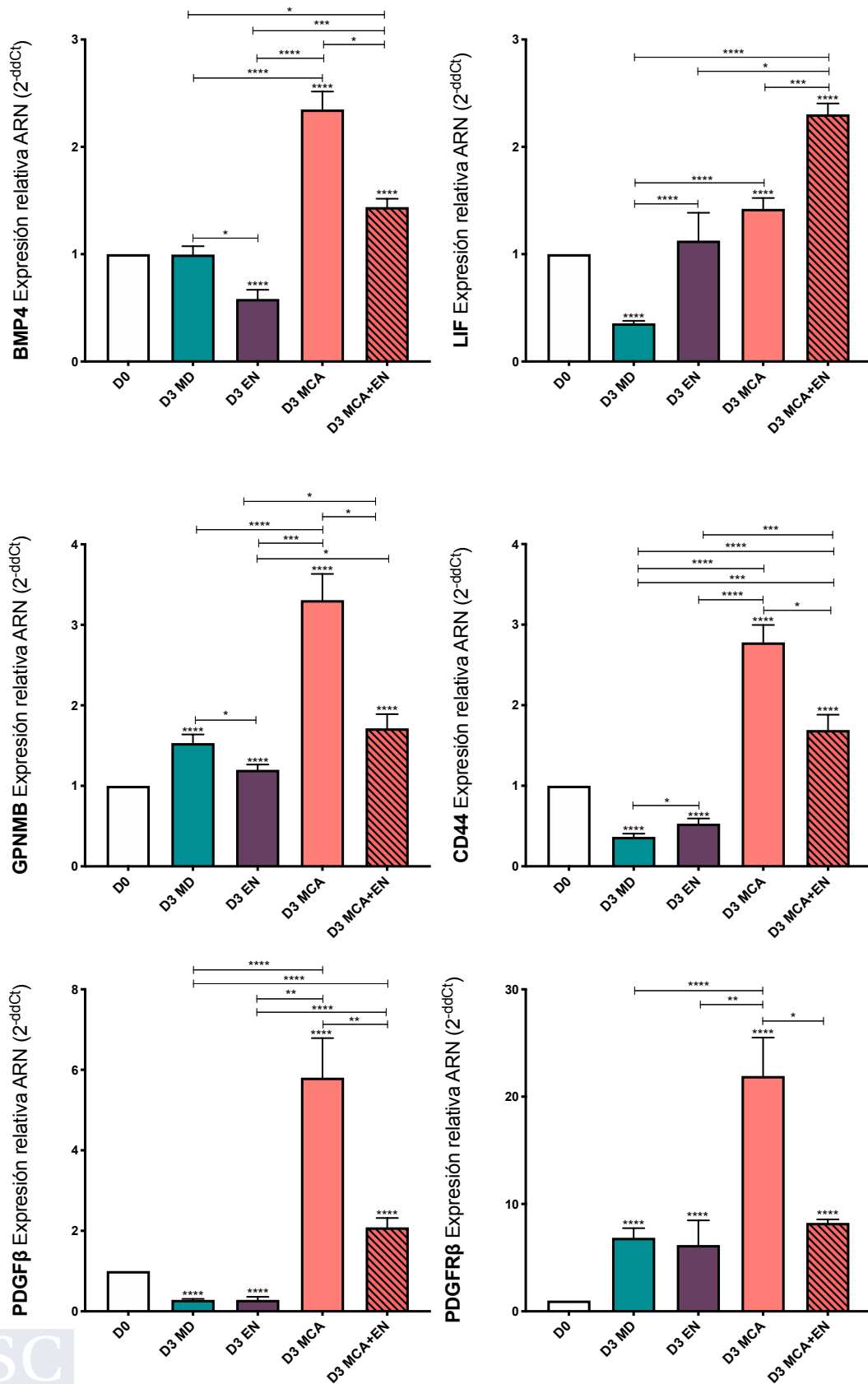
Teniendo en cuenta los efectos inflamatorios y anabólicos observados en la coexistencia de los EN y las SaOS2, se investigó el efecto de la combinación de los cocultivos de EN y SaOS2 estimulados con el MCA. Los resultados evidenciaron como la presencia de los EN incrementó significativamente los efectos del MCA en cuanto a la expresión génica de los marcadores osteoblásticos e inflamatorios *SPP1*, *BMP2*, *LIF*, *RANKL* y *CCL2* (Figura 21A-D). En relación con esto, cabe destacar la sinergia observada en el incremento de la expresión génica de *SPP1*, *LIF* y *CCL2* (Figura 21A,B,D). Por otra parte, los EN redujeron de forma significativa los niveles de expresión génica de *BMP4*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFβ*, *PDGFRβ* y *AXIN2* (Figura 21B-C). Asimismo, el MCA, más allá de la inducción sinérgica mencionada anteriormente, fue capaz de modular los efectos de los EN al potenciar de forma significativa la expresión de los marcadores *BMP4*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFβ*, *OPG* y *AXIN2* (Figura 21B-C); y reducir la expresión de los genes *RUNX2*, *RANKL* y el ratio *RANKL/OPG* (Figura 21A,C).

A



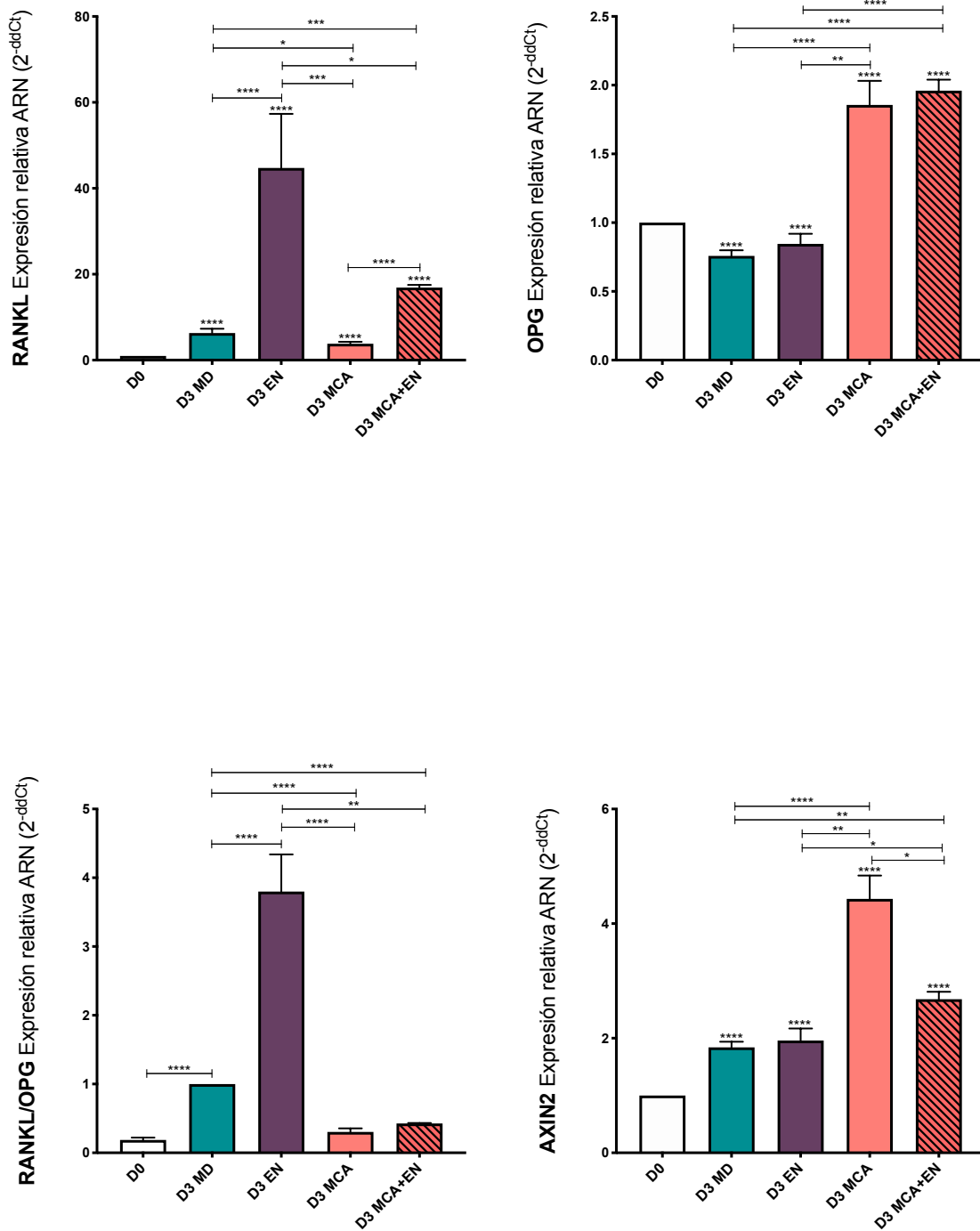
**Figura 21. Efecto del MCA sobre el cocultivo de EN y osteoblastos.** A) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores óseos *SPP1*, *RUNX2* y *BMP2* en las SaOS2 cocultivadas con los EN durante tres días en presencia o ausencia del MCA.

B



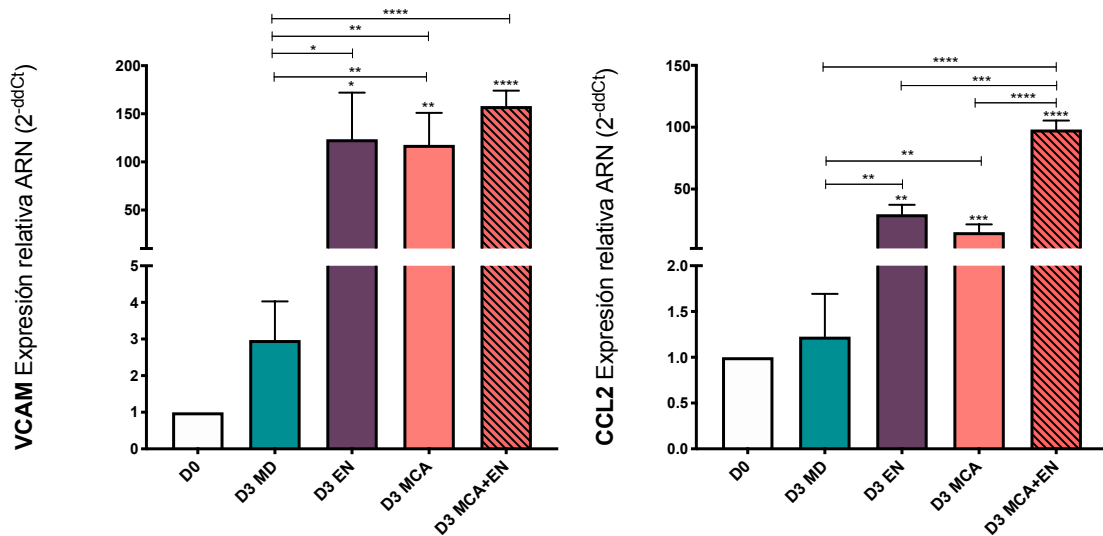
**Figura 21. Efecto del MCA sobre el cocultivo de EN y osteoblastos (continuación).** B) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores óseos *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFβ* y *PDGFRβ* en las SaOS2 cocultivadas con los EN durante tres días en presencia o ausencia del MCA.

C



**Figura 21. Efecto del MCA sobre el cocultivo de EN y osteoblastos (continuación).** C) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores óseos *RANKL*, *OPG*, ratio *RANKL/OPG* y *AXIN2* en las SaOS2 cocultivadas con los EN durante tres días en presencia o ausencia del MCA.

D



**Figura 21. Efecto del MCA sobre el cocultivo de EN y osteoblastos (continuación).** D) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores inflamatorios *VCAM* y *CCL2* en las SaOS2 cocultivadas con los EN durante tres días en presencia o ausencia del MCA.

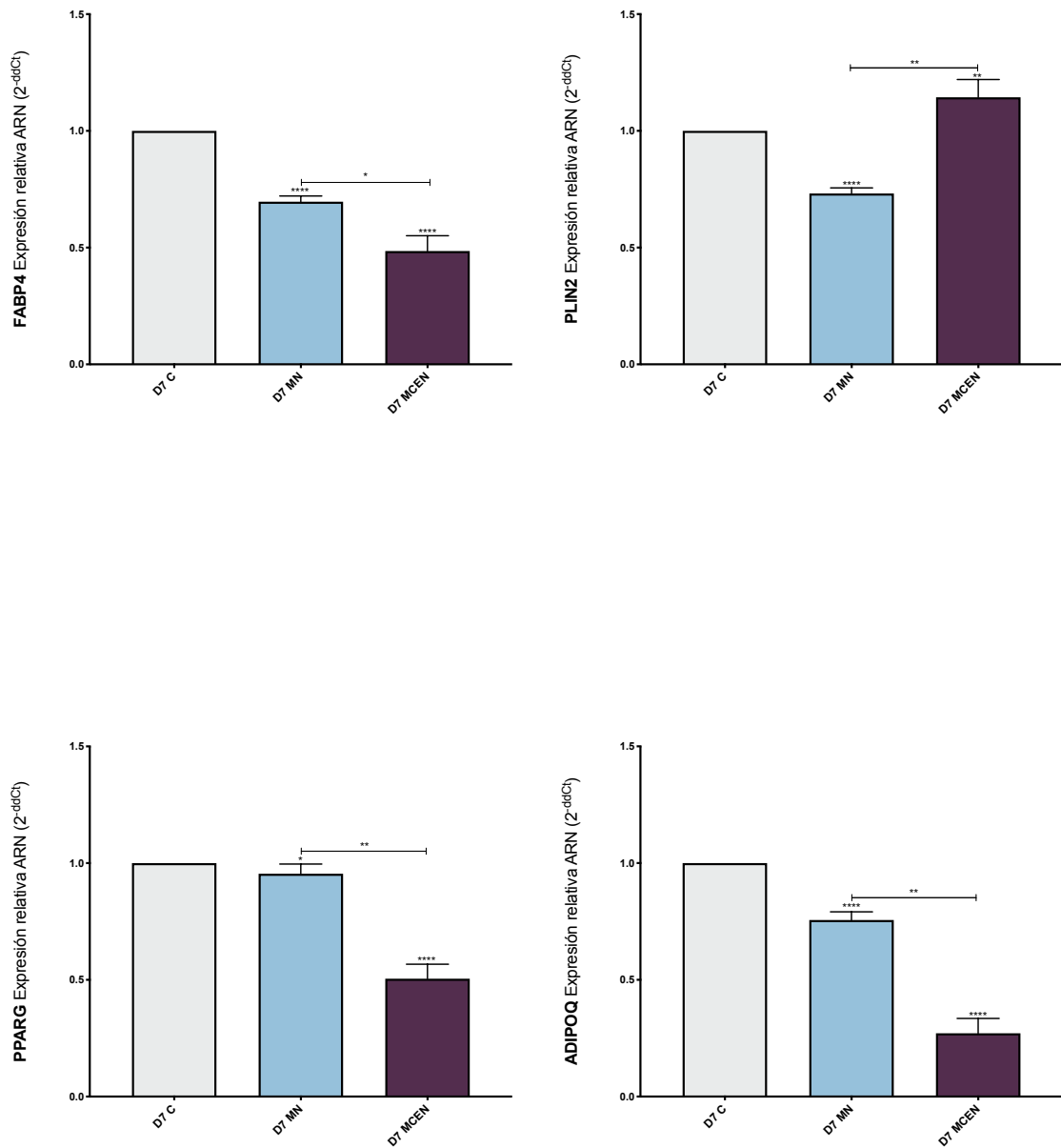
#### 4. EFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO POR LOS EXPLANTES NERVIOSOS EN LA ADIPOGÉNESIS

Considerando el balance entre la osteoblastogénesis y la adipogénesis, se testó el efecto del MCEN en las células C3H10T1/2 diferenciadas a adipocito durante siete días, y se estudiaron los principales marcadores de adipogénesis mediante RT-PCR. Los resultados evidenciaron un descenso significativo en la expresión génica de tres de los marcadores estudiados, *FABP4*, *PPARG* y *ADIPOQ*. Sin embargo, el MCEN incrementó la expresión de *PLIN2* (Figura 22A).

Del mismo modo se estudiaron los marcadores del metabolismo óseo e inflamatorios en el modelo de diferenciación a adipogénesis. Los datos obtenidos revelaron un incremento significativo en la expresión de *SPP1*, *CD44*, *IL6*, *VCAM* y *CCL2* en las células estimuladas con el MCEN (Figura 22B-C). No obstante, este medio no produjo cambios en la expresión de *RUNX2*, *GPNMB* y *AXIN2* (Figura 22B).

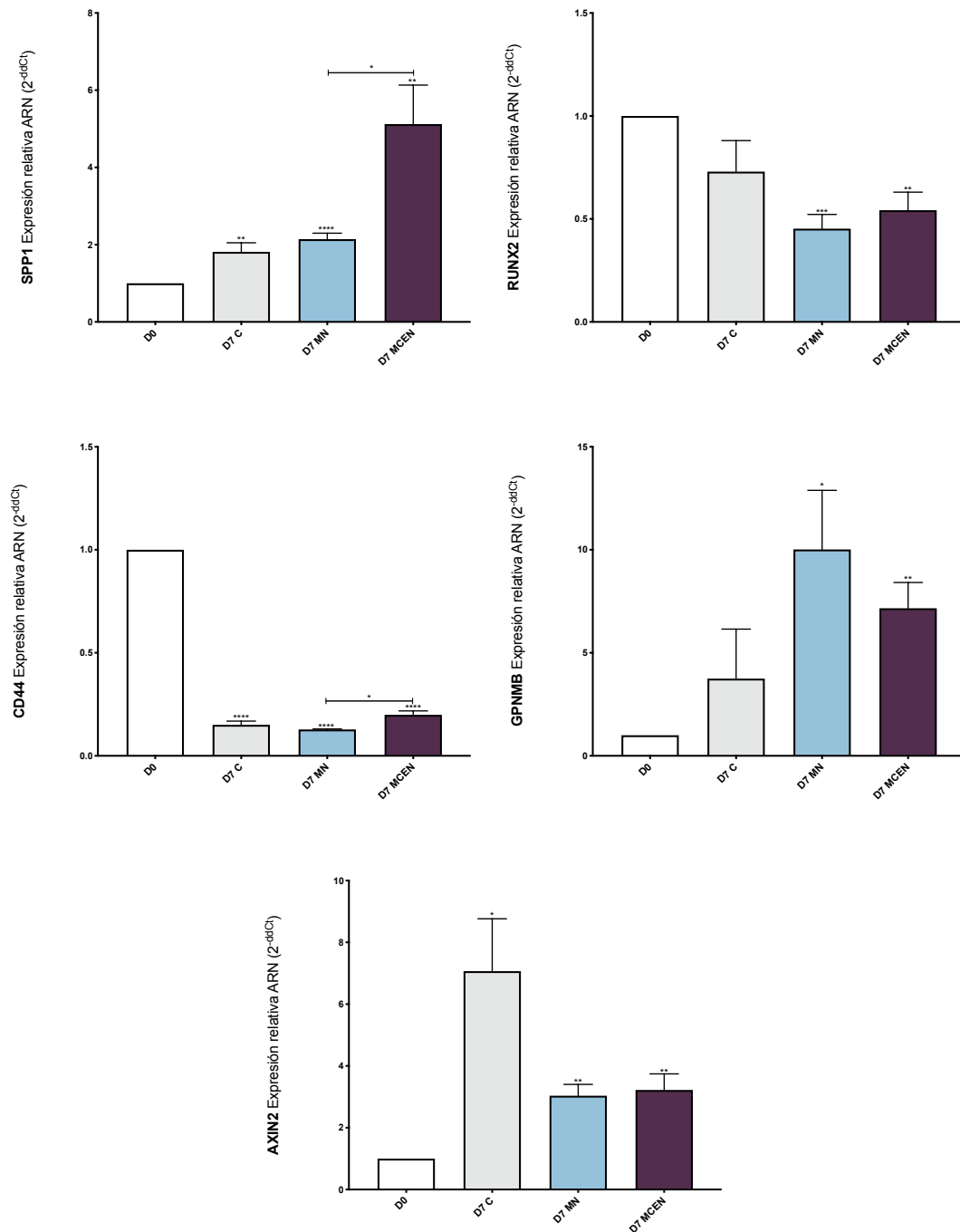


A

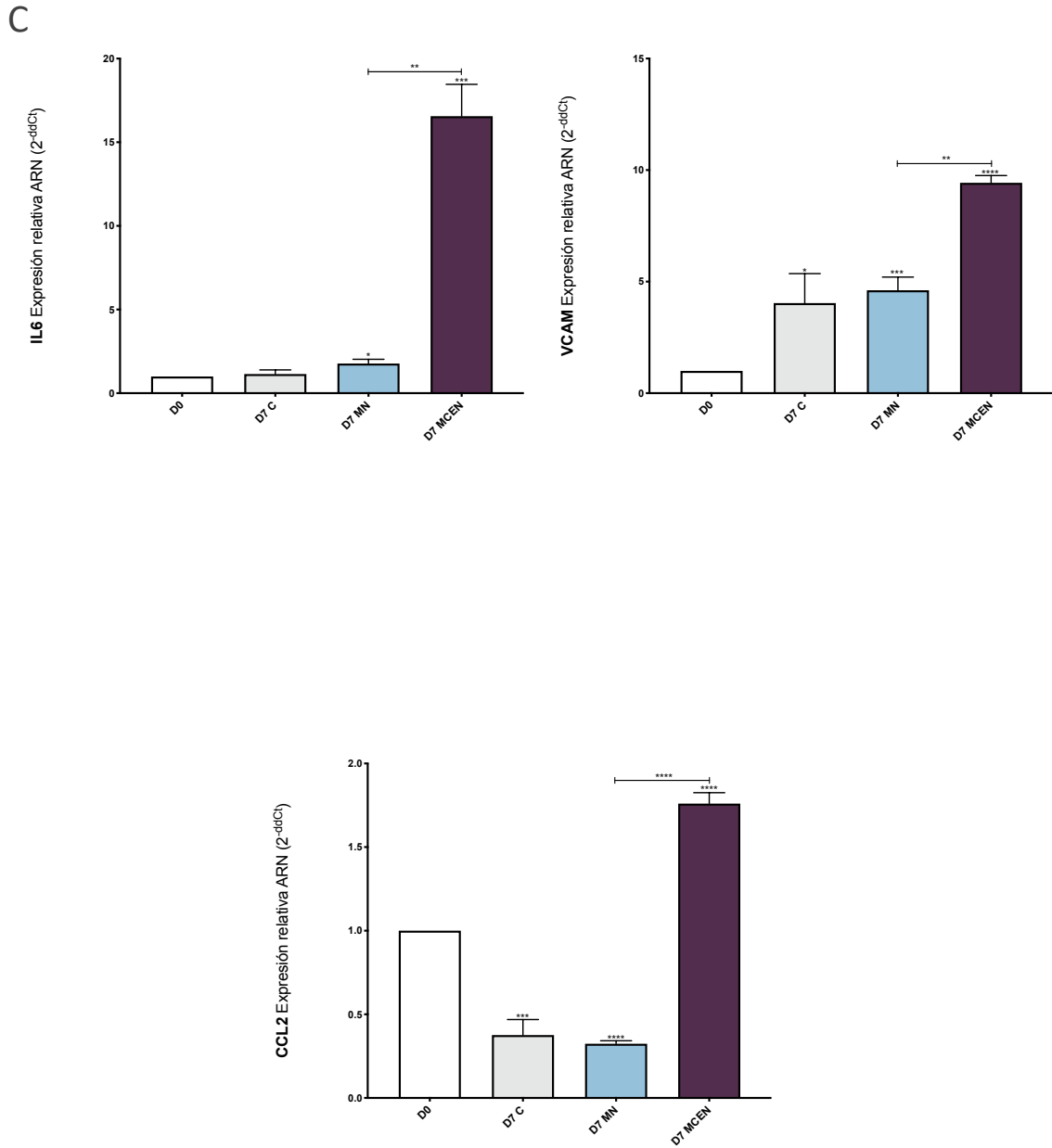


**Figura 22. Efecto del MCEN sobre la adipogénesis.** A) Expresión de los principales marcadores de la adipogénesis *FABP4*, *PLIN2*, *PPARγ* y *ADIPOQ* cuantificados mediante RT-PCR en la diferenciación de C3H10T1/2 a adipocito durante siete días en presencia y ausencia del MCEN.

B



**Figura 22. Efecto del MCEN sobre la adipogénesis** (continuación). B) Cuantificación mediante RT-PCR de la expresión génica de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *SPP1*, *RUNX2*, *CD44*, *GPNMB* y *AXIN2* en las células C3H10T1/2 diferenciadas a adipocito durante siete días en presencia o ausencia del MCEN.



**Figura 22. Efecto del MCEN sobre la adipogénesis (continuación).** C) Cuantificación mediante RT-PCR de la expresión génica de los marcadores inflamatorios *IL6*, *VCAM* y *CCL2* en las células C3H10T1/2 diferenciadas a adipocito durante siete días en presencia o ausencia del MCEN.

## 5. APARTADO AFECTADO POR LA PROTECCIÓN DE DERECHOS

## 6. APARTADO AFECTADO POR LA PROTECCIÓN DE DERECHOS

## 7. APARTADO AFECTADO POR LA PROTECCIÓN DE DERECHOS

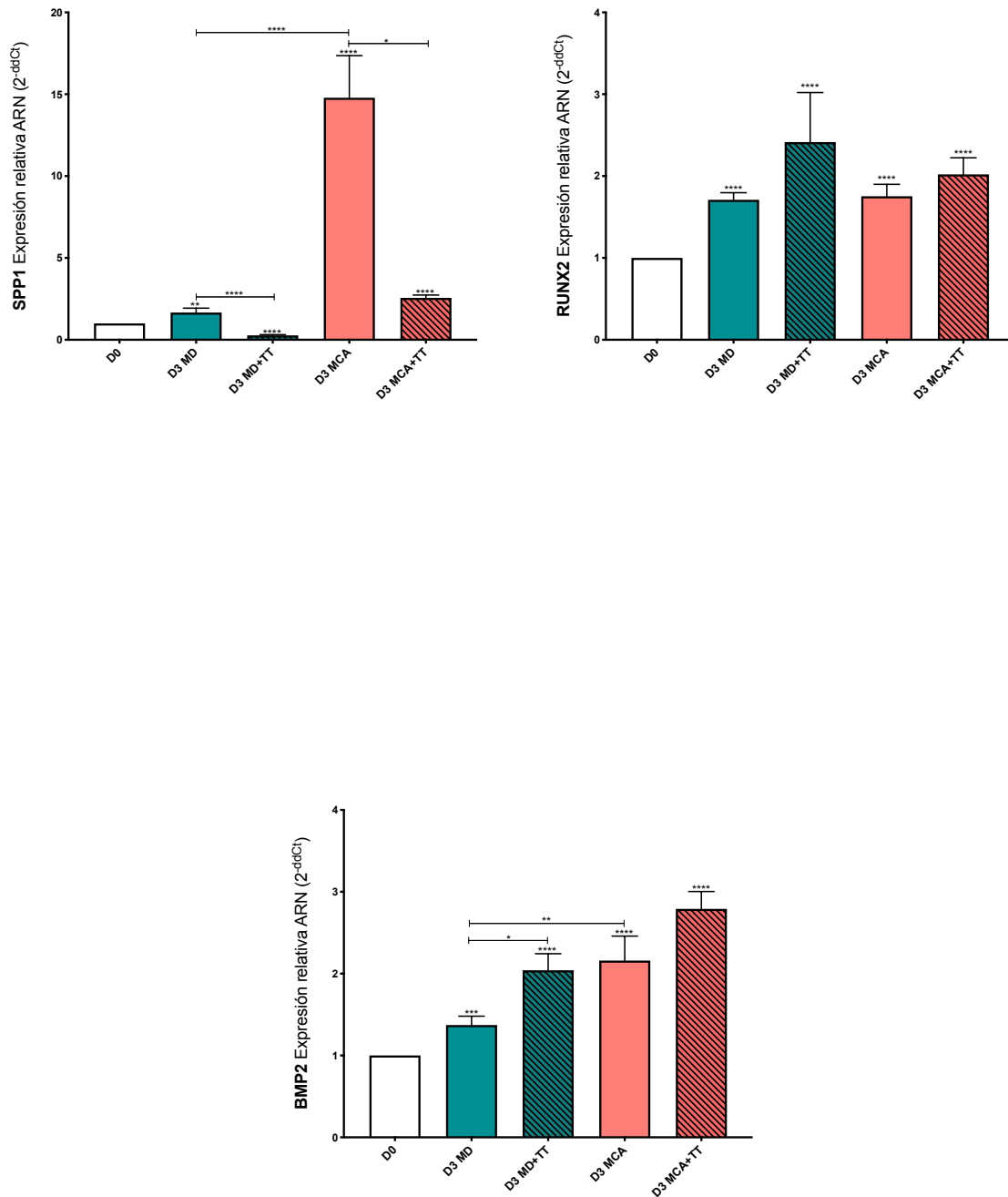
## 8. USO DE LA TRITERAPIA COMO TERAPIA PREVENTIVA FRENTE A LA OHN

Actualmente no existen tratamientos efectivos que permitan prevenir la aparición de la OH, lo que incrementa la necesidad de la búsqueda de nuevas terapias. Nuestro grupo de investigación desarrolló una terapia acuñada bajo el término TT (número de patente 300306701) compuesta por la combinación de un antidiabético (Pioglitazona, 10nM), un AINE (Indometacina, 60μM) y un corticoide (Dexametasona, 1μM). Dicha terapia está enfocada a prevenir la aparición de masas óseas ectópicas a través de la modulación del balance osteoblastogénesis-adipogénesis, a favor de la adipogénesis.

La TT fue testada en el modelo de diferenciación osteoblástica de SaOS2 durante tres días en presencia o ausencia del MCA. En condiciones basales, la TT disminuyó la expresión génica de los marcadores anabólicos e inflamatorios *SPP1*, *LIF*, *CD44*, *PDGFβ*, *CCL2* y el ratio *RANKL/OPG* (Figura 33A-D); aumentó la expresión génica de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *BMP2* y *OPG* (Figura 33A,C); y no modificó el resto de genes estudiados en el proceso de diferenciación osteoblástico (Figura 33A-D). Asimismo, los resultados demostraron un efecto notorio de la TT en la reducción de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo óseo *SPP1*, *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFRβ*, así como en la expresión génica de los marcadores inflamatorios *VCAM* y *CCL2* (Figura 33A-D) en los osteoblastos estimulados con el MCA durante tres días. Además, la TT aumentó la expresión génica de los marcadores *RANKL* y *OPG*. Sin embargo, dichos cambios no modificaron netamente el ratio *RANKL/OPG* (Figura 33C).

Asimismo, el tratamiento con la TT no modificó el resto de genes estudiados (Figura 33A-C).

A



**Figura 33. Efecto de la TT sobre el modelo de OHN *in vitro* con componente del SNC.** A) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los genes relacionados con el metabolismo óseo *SPP1*, *RUNX2* y *BMP2* en las SaOS2 diferenciadas a osteoblasto durante tres días en presencia o ausencia de la TT (pioglitazona 10nM, indometacina 60µM y dexametasona 1µM).

B

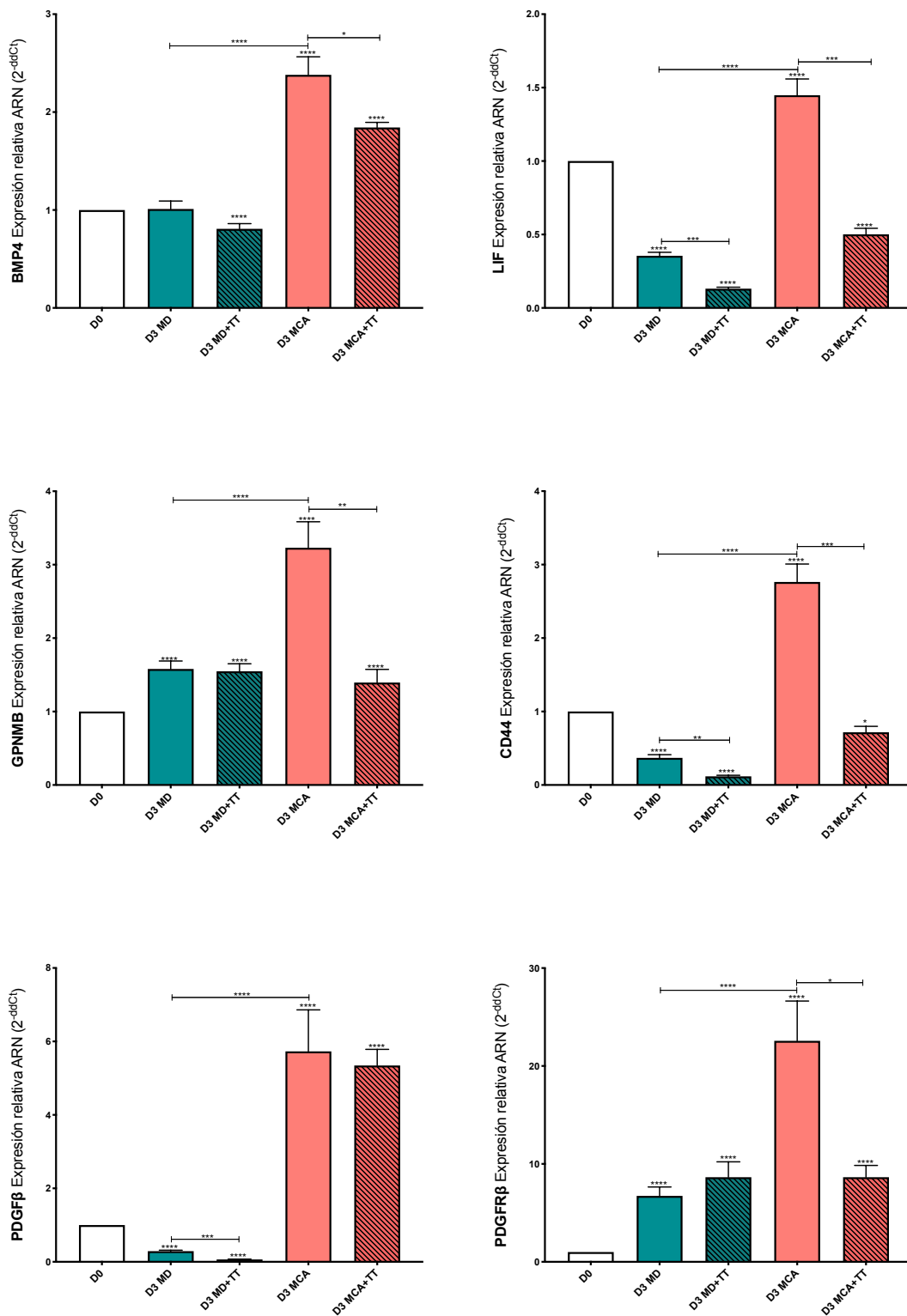
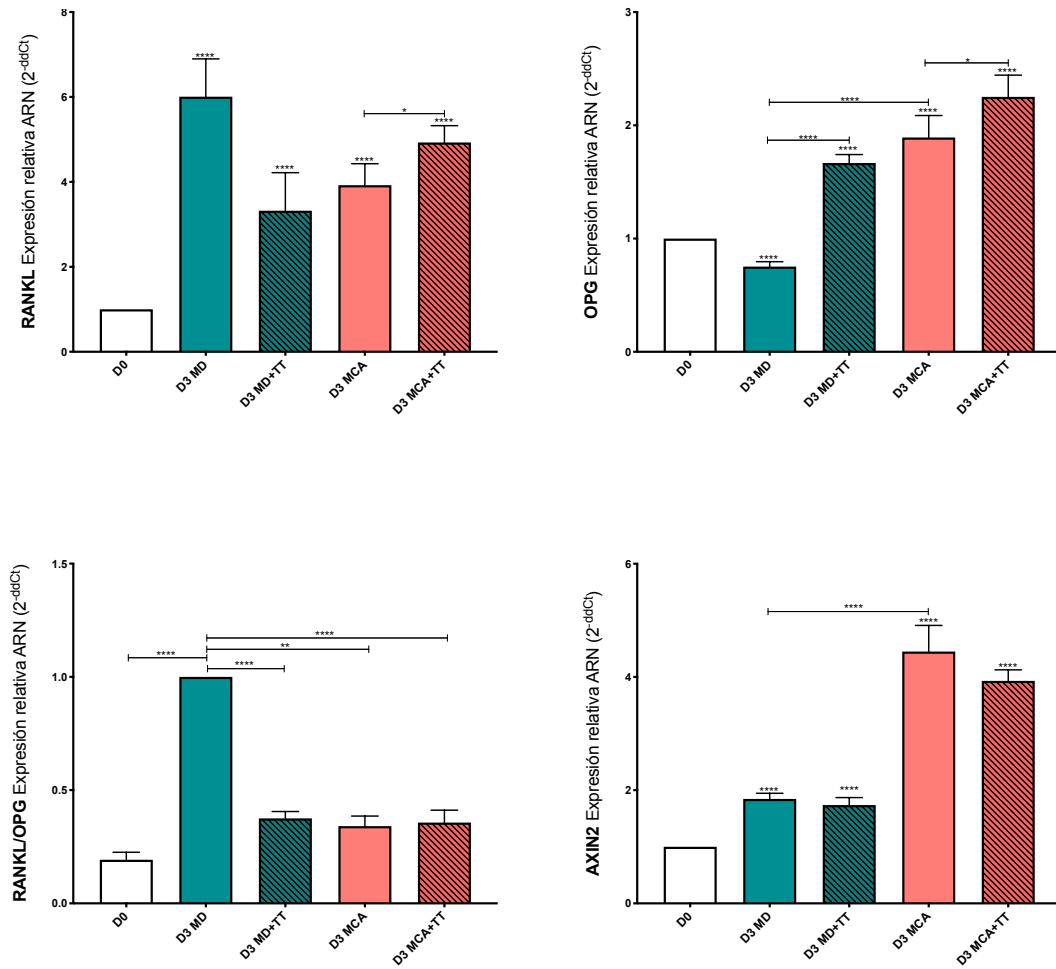


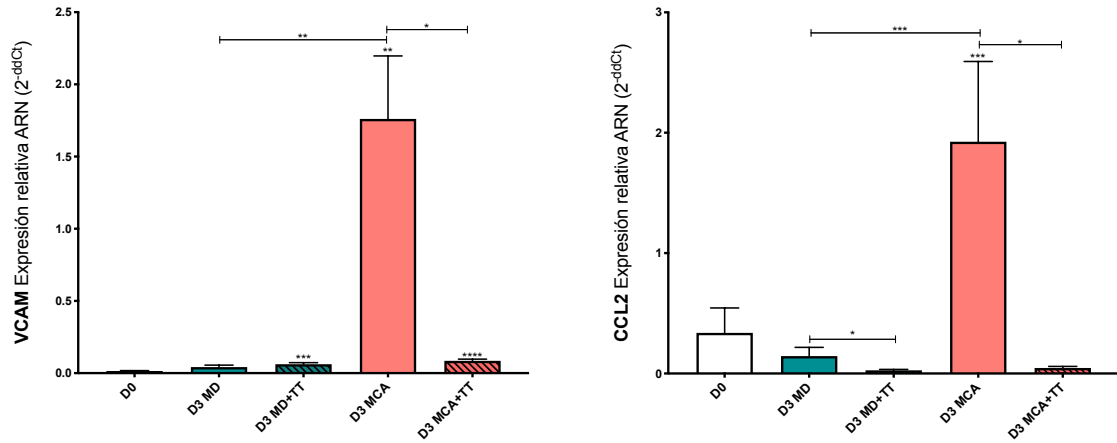
Figura 33. Efecto de la TT sobre el modelo de OHN *in vitro* con componente del SNC (continuación). B) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los genes relacionados con el metabolismo óseo *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFβ* y *PDGFRβ* en las SaOS2 diferenciadas a osteoblasto durante tres días en presencia o ausencia de la TT (pioglitazona 10nM, indometacina 60μM y dexametasona 1μM).

C



**Figura 33. Efecto de la TT sobre el modelo de OHN *in vitro* con componente del SNC (continuación).** C) Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR de los genes relacionados con el metabolismo óseo *RANKL*, *OPG*, ratio *RANKL/OPG* y *AXIN2* en las SaOS2 diferenciadas a osteoblasto durante tres días en presencia o ausencia de la TT (pioglitazona 10nM, indometacina 60µM y dexametasona 1µM).

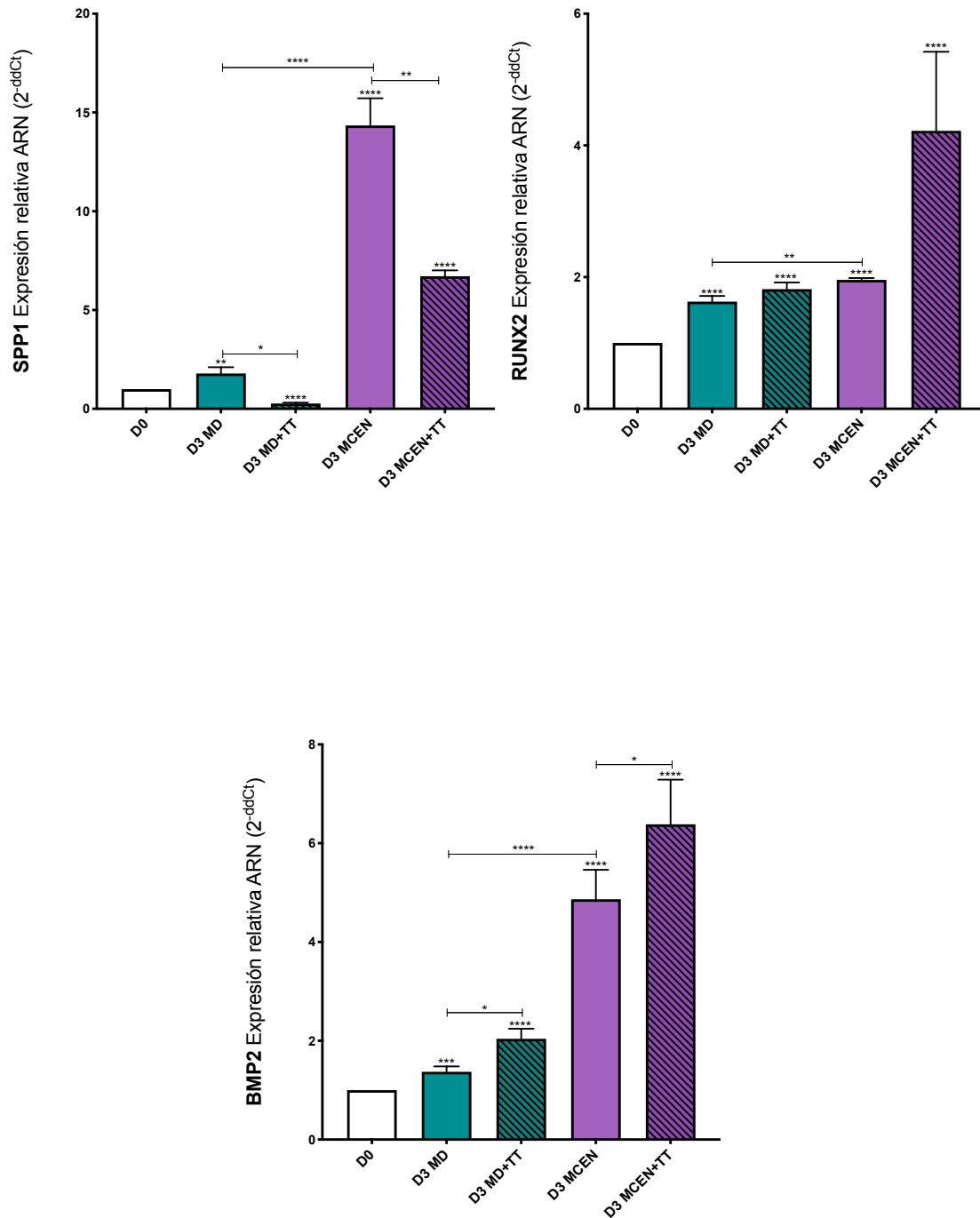
D



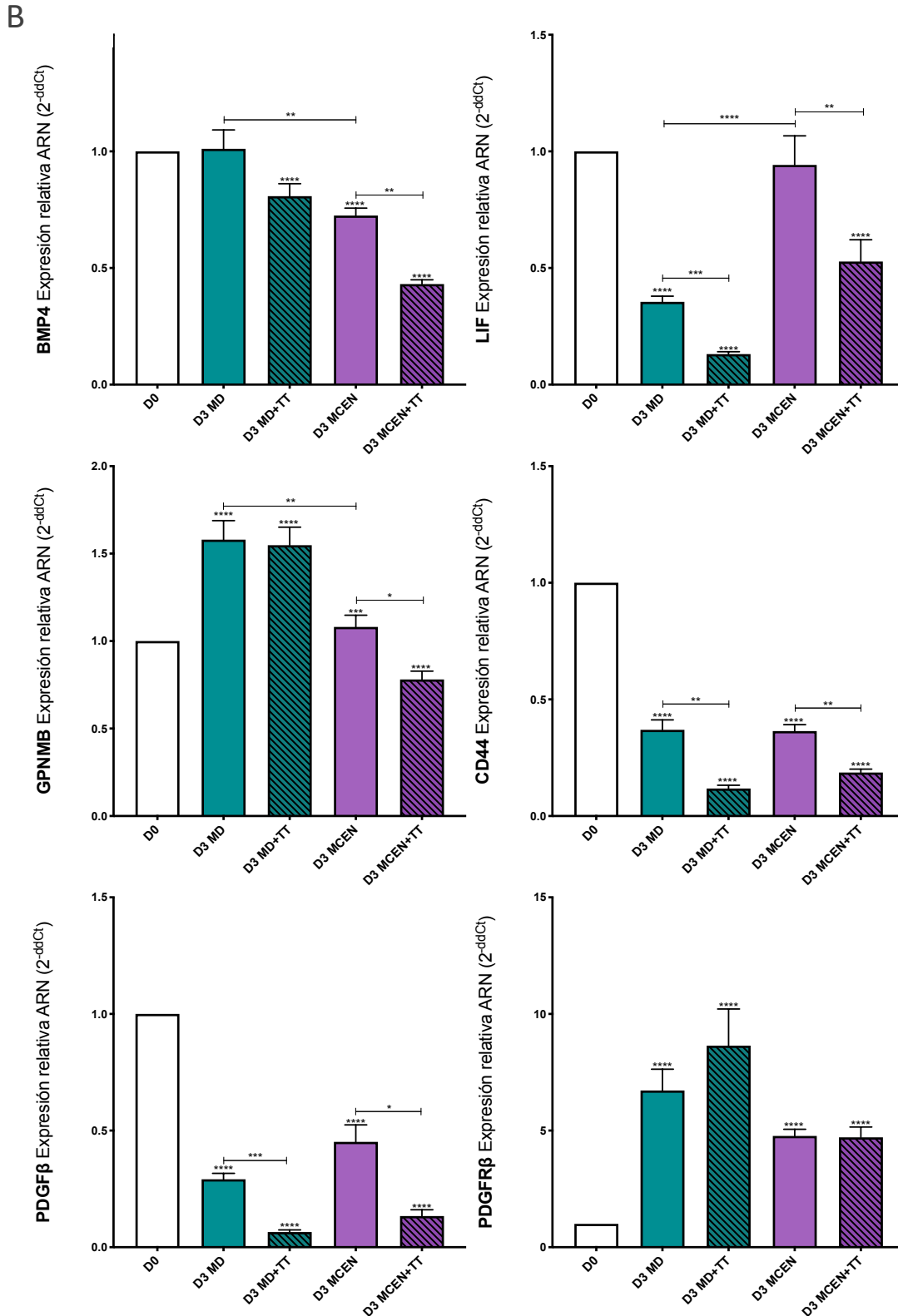
**Figura 33. Efecto de la TT sobre el modelo de OHN *in vitro* con componente del SNC (continuación).** D) Expresión génica de los marcadores inflamatorios medidos mediante RT-PCR *VCAM* y *CCL2* en el proceso de osteoblastogénesis en presencia o ausencia de la TT.

Esta terapia también fue testada en las diferenciaciones de SaOS2 en presencia del MCEN durante tres días. Interesantemente, la TT fue capaz de disminuir los niveles de *SPP1*, *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFRβ*, *AXIN2* y *CCL2* (Figura 34A-D) en las SaOS2 estimuladas con el MCA. Sin embargo, la TT indujo el aumento en la expresión de los marcadores *RUNX2* y *BMP2* en las SaOS2 estimuladas con el MCEN (Figura 34A,C), y no modificó la expresión de *PDGFRβ*, *RANKL*, *OPG*, el ratio *RANKL/OPG* y *VCAM* (Figura 34B-D) en los osteoblastos estimulados con el MCA.

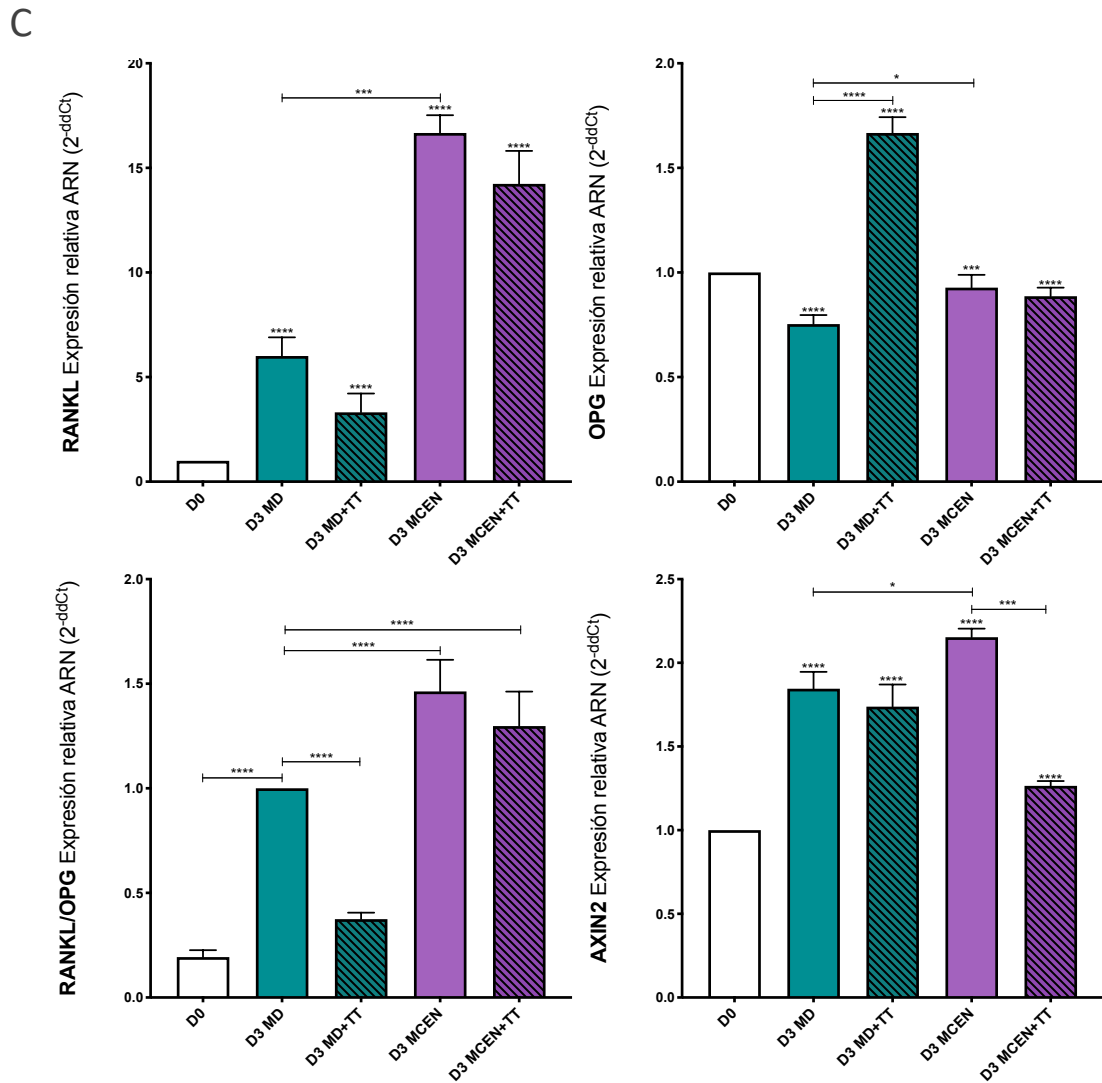
A



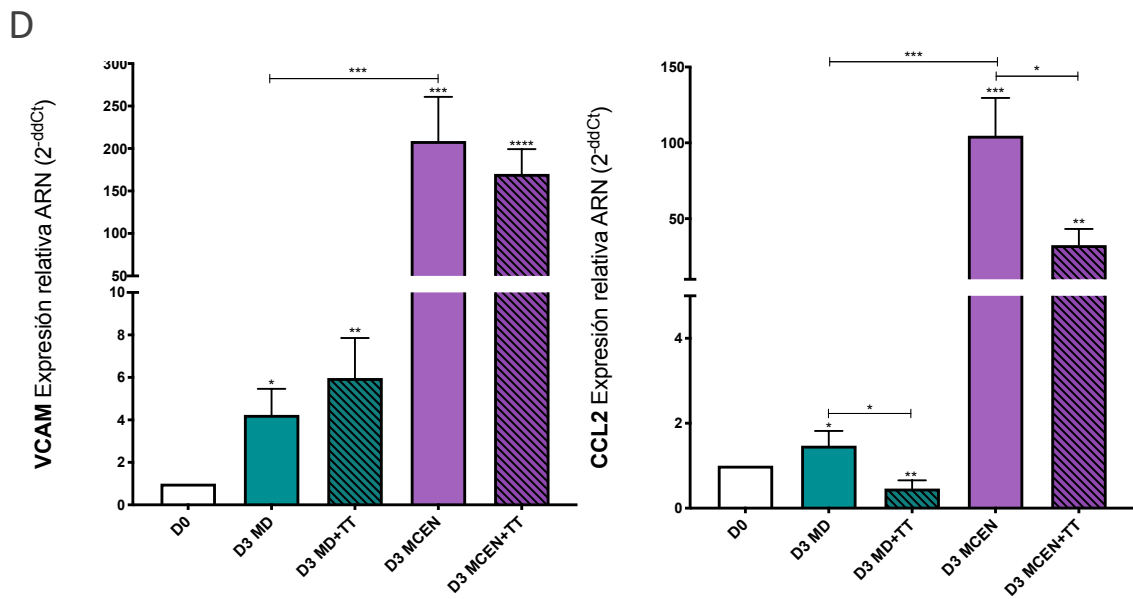
**Figura 34. Impacto de la TT sobre el modelo de OHN *in vitro* con componente del SNP.** A) Determinación mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *SPP1*, *RUNX2* y *BMP2* en las células SaOS2 diferenciadas durante tres días en presencia o ausencia de la TT (pioglitazona 10nM, indometacina 60µM y dexametasona 1µM).



**Figura 34. Impacto de la TT sobre el modelo de OHN *in vitro* con componente del SNP (continuación).** B) Determinación mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *BMP4*, *LIF*, *GPNMB*, *CD44*, *PDGFRβ* y *PDGFB* en las células SaOS2 diferenciadas durante tres días en presencia o ausencia de la TT (pioglitazona 10nM, indometacina 60μM y dexametasona 1μM).



**Figura 34. Impacto de la TT sobre el modelo de OHN *in vitro* con componente del SNP (continuación).** C) Determinación mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *RANKL*, *OPG*, ratio *RANKL/OPG* y *AXIN2* en las células SaOS2 diferenciadas durante tres días en presencia o ausencia de la TT (pioglitazona 10nM, indometacina 60µM y dexametasona 1µM).



**Figura 34. Impacto de la TT sobre el modelo de OHN *in vitro* con componente del SNP (continuación).** D) Estudio de la expresión génica mediante RT-PCR de los marcadores inflamatorios *VCAM* y *CCL2* en el proceso de diferenciación a osteoblasto en presencia o ausencia de la TT.



## DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral se ha determinado la capacidad de los astrocitos y los EN para liberar factores promotores del anabolismo óseo y la inflamación y, a su vez, inhibir la adipogénesis. Asimismo, se ha identificado una proteína como potencial proteína relacionada con la formación ectópica de hueso debido a su alta expresión en pacientes con alto riesgo de padecer OHN, así como a su capacidad de reproducir parcialmente los efectos observados por los astrocitos y los nervios periféricos sobre los procesos de osteoblastogénesis y adipogénesis. Finalmente, se han conseguido revertir parcialmente los efectos sobre el anabolismo óseo e inflamación inducidos por los factores liberados por los astrocitos y los EN en los osteoblastos mediante el uso de una terapia preventiva frente a la OH patentada por nuestro grupo de investigación.

La OHN es una enfermedad que se caracteriza por la formación de hueso laminar maduro en tejidos blandos extra-esqueléticos, cuya etiología permanece a día de hoy desconocida (40–44). Sin embargo, se han postulado diferentes factores de riesgo para padecer esta enfermedad, entre los cuales destacan haber sufrido un TCE o una lesión medular (40,43,46). Acorde con esto, en los últimos años se han acumulado evidencias científicas que sostienen un posible papel de los factores humorales con origen en el SNC y SNP como responsables del crecimiento de hueso anómalo (40,41,62–68,42,43,46–49,57,61). Ante esta situación, y con la finalidad de identificar algún factor responsable de esta enfermedad, nos propusimos determinar la capacidad osteoinductiva de los astrocitos, EN, CEN y sueros de pacientes con mayor o menor riesgo de padecer OH; así como proceder con la caracterización proteómica de estas muestras. Por otra parte, a día de hoy no existe una terapia efectiva que permita prevenir la aparición de la OH, por lo que urge investigar nuevas terapias para abordar esta enfermedad. Por ello, se ha testado la TT como una potencial terapia preventiva frente a esta patología en los modelos de OHN desarrollados

*in vitro.*

Como se ha mencionado previamente, las lesiones que afectan al SNC se consideran factores de riesgo vinculados a la formación ectópica de hueso. De

hecho, se ha descrito la presencia de factores anabólicos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que sufrieron este tipo de daños (48,49,61–64). Estos datos concuerdan con las correlaciones observadas entre el proteoma sérico de pacientes en riesgo de padecer OHN y sus efectos anabólicos sobre cultivos de osteoblastos. Concretamente, pudimos observar cómo los pacientes con elevado riesgo de padecer OHN, aquellos que sufrieron el doble traumatismo, tenían un proteoma sérico con un mayor número de correlaciones con los marcadores anabólicos óseos inducidos en los cultivos de osteoblastos.

En la actualidad no existe ningún modelo *in vitro* que permita el estudio de la OHN. Por este motivo, hemos desarrollado un modelo de OHN basado en el cocultivo de astrocitos y osteoblastos. La selección de estas células gliales como potenciales células implicadas en el desarrollo de la OHN se basó en su procedencia, un glioblastoma humano de grado IV (línea celular CCF-STTG1), así como en las múltiples implicaciones de las mismas en procesos fisiológicos y fisiopatológicos en respuesta a un daño neurológico (1,5,9,17,18). En concreto, la selección de estas células se centró en la estrecha similitud entre los procesos tempranos de astrogliosis derivados de un daño nervioso y los glioblastomas, semejanzas que dificultan el diagnóstico diferencial entre ambas alteraciones y que a menudo conllevan al establecimiento de un diagnóstico erróneo (90–92). En este sentido, cabe destacar que existen evidencias que señalan a los astrocitos reactivos como responsables de la liberación de factores relacionados con el anabolismo óseo que, a su vez, se relacionan con calcificaciones ectópicas (93).

Una vez establecido el modelo de OHN *in vitro*, procedimos con su estudio y validación. Se ha descrito que, en la formación de hueso ectópico, se produce una coexistencia y convergencia entre los procesos anabólicos e inflamatorios (40–44,47,48,52,53,57), los cuales se vieron incrementados en el modelo *in vitro* de OHN desarrollado.

Por una parte, este modelo fue capaz de reproducir algunas de las alteraciones características de esta patología que atañen al anabolismo óseo, entre las cuales destacan el incremento de la expresión génica de los marcadores óseos *BMP2* (40–44,47,52,94), *BMP4* (40–44,47,52,94), *SPP1* (40–44,47,52) y *GPNMB* (93). Asimismo, cabe destacar el aumento de *CD44*, receptor de *SPP1* (95,96),

marcador crucial en los procesos formadores de hueso (97). De este modo, este modelo no solo permitió observar el incremento en la expresión de *SPP1*, sino que también la expresión génica de su receptor, lo que podría incrementar su señalización y promover un mayor efecto de *SPP1* y, por extensión, una mayor formación anómala de hueso.

Diversos estudios han puesto de manifiesto el incremento de la *PDPN*, un marcador osteocítico temprano, en las zonas limítrofes de algunos tipos de calcificaciones cerebrales y de vasos sanguíneos (93,98,99). En concreto, a nivel intracraneal, se ha probado la presencia de astrocitos reactivos, así como un aumento en la expresión de este gen, en las zonas circunscritas a las calcificaciones (93,100). Refrendando el valor de nuestro modelo, en el presente estudio también se observó la capacidad de los factores secretados por los astrocitos para promover cambios morfológicos semejantes a los osteocitos en los osteoblastos, incrementándose además en estos la expresión génica de *PDPN* (93). Estos datos sugieren que la disrupción de la BHE producida tras un TCE podría facilitar la transferencia de este proceso de calcificación observado a nivel intracraneal en estructuras periféricas.

Asimismo, se ha descrito el incremento de las *BMPs* como principales moléculas implicadas en la OH, tanto en las formas congénitas de la enfermedad como en las adquiridas (40–44,47,52,94), así como la interacción de las mismas con la vía *WNT*, principal vía anabólica del hueso y esencial para promover la maduración de los condrocitos y osteoblastos (94). En este sentido cabe destacar que este modelo no solo permitió observar el aumento de la expresión de las *BMPs*, sino que también facilitó la observación de la activación de la vía *WNT*, lo que se demuestra mediante el aumento de *AXIN2* y la inhibición de los antagonistas de la misma *SOST* y *DKK1*, hechos que avalan el potencial anabólico de los astrocitos sobre los osteoblastos y la efectividad de nuestro modelo *in vitro* para el estudio de la OHN.

Por otra parte, se ha descrito el rol de los procesos inflamatorios mediados por el sistema inmune innato y adaptativo en la fisiopatología de la OH (40,60,101–103). En este estudio se evidenció mediante proteómica la activación de rutas relacionadas con ambos tipos de inmunidad en los pacientes en alto riesgo de padecer OH debido a la concomitancia de un TCE y una FHL.

Asimismo, evidenciando el papel de la inflamación en los procesos de daño central y su efecto en el metabolismo óseo, los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron un incremento de las citoquinas inflamatorias *IL6*, *VCAM* y *CCL2* en los osteoblastos estimulados con el MCA. Cabe señalar que estas citoquinas han sido relacionadas con la OH en diversos estudios (104–107).

En relación con las respuestas inflamatorias asociadas a la etiopatogenia de la OH destacan las mediadas por el eje monocito-macrófago y mastocitos (104,105,108,109). Se ha demostrado que, al producirse un daño en el organismo, los monocitos circulantes infiltran el lugar de la lesión, lo que promueve su transición a macrófagos. Los macrófagos, a su vez se polarizan para liberar un amplio espectro de mediadores inflamatorios entre los cuales destacan la *IL1 $\beta$*  y diversos agonistas del *TLR4* (104,105,108,109). Estas respuestas favorecen la activación de los mastocitos, células mediadoras de las respuestas inmunes. En el contexto de la OH, la activación de estas células se ha relacionado con el reclutamiento de monocitos y osteoprogenitores, contribuyendo de este modo a la formación de hueso ectópico (104,105,108,109). En relación con esto, es bien conocido el papel que desempeñan la *IL1 $\beta$*  y los agonistas del *TLR4* en la mediación de las respuestas inmunes innatas a través de sus respectivos receptores *IL1-R1* y *TLR4*, los cuales a su vez comparten sus rutas de señalización a través de MyD88 (110–112).

Para tratar de esclarecer el papel de la inmunidad innata en nuestro modelo *in vitro*, los osteoblastos fueron diferenciados con el MCA y estimulados en presencia o ausencia de *IL1 $\beta$*  y LPS (agonista del *TLR4*). La adición de *IL1 $\beta$*  como estímulo inflamatorio externo potenció los efectos inflamatorios previamente observados e indujo la expresión de los marcadores relacionados con el metabolismo óseo *BMP2* y *LIF*. En relación con esto, estudios realizados en modelos animales han puesto de manifiesto la implicación de *LIF* en el desarrollo de masas óseas excesivas y calcificaciones ectópicas (113,114), ya que actúa como promotor de la osteoblastogénesis e inhibidor de la adipogénesis y debido a su implicación en los procesos de reparación ante un daño tisular (113,115–118). Estos datos verifican el rol de la inflamación en la potenciación de marcadores anabólicos claves relacionados con el metabolismo óseo, y su

posible relación con la formación ectópica de hueso (35,40,48,57). Por el contrario, el efecto de la estimulación con el LPS no modificó ninguno de los genes estudiados, lo cual sugiere que el proceso inflamatorio desencadenado por el MCA es independiente de MyD88.

Recientemente se ha vinculado el daño en el SN con el desarrollo de la OH (16,48,52,54,55,57,60). Para tratar de mimetizar la aberrante comunicación entre el SNC, el SNP y las células precursoras osteoblásticas subyacente a un TCE y a una FHL, se llevaron a cabo cocultivos de osteoblastos y EN o CEN, en presencia o ausencia del MCA. Los resultados obtenidos confirmaron la potencial implicación de ambos SNs (SNC y SNP) en la modulación del metabolismo óseo tras producirse el incremento en la expresión de los genes relacionados con el anabolismo óseo y la inflamación en los cocultivos de SaOS2 con los EN y las CEN. Cabe destacar que estos efectos fueron semejantes a los observados tras la estimulación de los osteoblastos con el MCA. Sin embargo, se observaron resultados opuestos en los cocultivos de los EN en comparación con el MCA en cuanto a la expresión de los genes *BMP4*, *GPNMB*, *RANKL* y el ratio *RANKL/OPG*. En concreto, la coexistencia de los EN y los osteoblastos redujo la expresión de *BMP4* y *GPNMB*, e incrementó la expresión de *RANKL* y el ratio *RANKL/OPG*. Sin embargo, cuando los cocultivos de EN y osteoblastos se estimularon con el MCA, se incrementó la expresión basal de *BMP4*, mientras que el ratio *RANKL/OPG* se reguló a la baja, demostrando el potente efecto anabólico de los factores liberados por los astrocitos sobre el metabolismo óseo (119–121), siendo incluso capaces de modular las respuestas producidas por estructuras periféricas. Además, en nuestro modelo de OH con componente nervioso central y periférico se demostró la sinergia de ambos SNs para incrementar la expresión de *SPP1*, *LIF* y *CCL2*, marcadores íntimamente relacionados con la OH (40,41,107,113,114,42–44,47,52,104–106).

*Grosso modo*, a pesar de las pequeñas idiosincrasias entre los modelos de cocultivos de osteoblastos y el MCA o los EN, cuando ambos modelos coexistieron, se observó una modulación entre ambos componentes con una clara tendencia a incrementar los genes anabólicos e inflamatorios estudiados, lo que coincide con lo descrito en la literatura acerca de la implicación del SNC

y SNP en el metabolismo óseo promoviendo la OH (16,48,60–65,49–52,54–57). Asimismo, los cocultivos de osteoblastos y las CEN incrementaron, aunque en menor medida que los EN, la expresión de *SPP1* y *VCAM*. El hecho de que las CEN no indujeran grandes cambios transcriptómicos podría ser debido a la diferencia en el número de células que componen los EN y las CEN sembradas en este modelo experimental. De este modo, la disminución de la densidad celular se relacionaría con una menor celeridad de las mismas para modificar los marcadores óseos e inflamatorios estudiados en un período de tres días. Sin embargo, este hallazgo no debería ser subestimado puesto que se ha descrito la capacidad migratoria de las células nerviosas al torrente sanguíneo en zonas donde se desarrolla la OH (56,70,71). Partiendo de esta premisa, la migración de estas células las dotaría de la capacidad para reproducir parcialmente el fenotipo de los EN descrito en este trabajo y, consecuentemente, potenciar la formación de hueso anómalo en los tejidos periféricos diana.

Por otra parte, los cocultivos de osteoblastos con el MCA y los EN redujeron la expresión de los genes adipogénicos esenciales, incrementaron la expresión de los genes anabólicos e inflamatorios, así como la proliferación de las *MSCs* en el modelo de diferenciación de las mismas a adipocito. Estos datos resaltan la capacidad moduladora conjunta de los factores liberados por los astrocitos y los EN sobre el equilibrio entre la osteoblastogénesis y la adipogénesis, en detrimento de la adipogénesis. La única discordancia observada entre ambos modelos fue el incremento de *PLIN2* en las *MSCs* diferenciadas con el MCEN, hecho que podría coincidir con un mecanismo compensatorio al reducirse los demás genes relacionados con el metabolismo adipogénico, incluyendo *PPARG*, gen considerado como el regulador maestro de la adipogénesis (122). La disminución de los genes adipogénicos y el aumento en la expresión de los genes anabólicos e inflamatorios en las *MSCs* diferenciadas a adipocito reproduce y concuerda con lo descrito para algunas variantes de OH congénita, en las cuales la osificación dérmica superficial y la formación *de novo* de placas ectópicas en la piel y en la grasa subcutánea se considera una característica resaltable (123–127).

Párrafos afectados por la protección de derechos.

Finalmente, en esta tesis doctoral se estudió el uso de la TT, compuesta por dexametasona, indometacina y pioglitazona, como plausible abordaje terapéutico frente a la OHN debido a la capacidad anti-anabólica que presenta este cóctel de fármacos (128–134). Estudios previos realizados en nuestro grupo han demostrado la efectividad de esta terapia para alterar el balance osteoblastogénesis-adipogénesis *in vitro* a favor de la adipogénesis, así como la capacidad de la misma para reducir los marcadores anabólicos séricos en un caso de HOP pediátrico. Por ello, se testó la TT en los modelos de OHN *in vitro* (cultivos de osteoblastos con los MCA o MCEN), confirmándose su eficacia para reducir en los osteoblastos genes esenciales relacionados con el metabolismo óseo e inflamatorio, entre los cuales destacan *SPP1*, *BMP4*, *LIF*, *GPNMB* y *CCL2* (40,41,105–107,113,114,42–44,47,52,93,94,104). En este trabajo, la TT indujo la expresión de *RUNX2* y *BMP2* en los osteoblastos estimulados con el MCEN durante tres días, hecho no observable en los osteoblastos tratados con el MCA. Aunque en principio estos hallazgos podrían sugerir un efecto contrario de la TT ante un daño nervioso periférico, se ha descrito en la literatura la inducción de *RUNX2* como un fenómeno transitorio de esta terapia (135–138).

En relación con esto, cabe destacar que los efectos de la TT fueron observados a tres días de diferenciación osteoblástica, lo que podría explicar los resultados obtenidos al tratarse de un corto período de tiempo susceptible de desencadenar mecanismos compensatorios debido al fuerte impacto de esta terapia en los demás genes anabólicos estudiados. Además, el hecho de que estos incrementos no se observen en los osteoblastos diferenciados con el MCA, cuyos efectos fueron más potentes que los observados en los MCEN, confirma la posibilidad de tratarse de un efecto circunscrito a este tiempo y modelo de diferenciación en concreto. Asimismo, cabe destacar que la incidencia de la OHN incrementa ante la coexistencia de una lesión nerviosa central y periférica, siendo prácticamente inexistente cuando solo sucede la lesión periférica (40,43,46,57). En nuestros estudios hemos demostrado una mayor contribución del SNC en la inducción de los genes anabólicos involucrados con la diferenciación osteoblástica. Teniendo esto en cuenta, cabría esperar que ante una concomitancia de una lesión central y periférica, las

## Discusión

acciones tan abrumadoras de la TT sobre los efectos del SNC dominen y sean suficientes para bloquear el desarrollo de una masa ectópica ósea.

## **CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONES

- El cocultivo de astrocitos y osteoblastos proporciona un modelo *in vitro* válido para el estudio de la OHN.
- Los factores derivados de los astrocitos y los EN presentan un potencial osteoformador, proinflamatorio y anti-adipogénico capaces de potenciar el proceso de osteoblastogénesis.
- La presencia de un ambiente inflamatorio promovido por la *IL1 $\beta$*  potencia los marcadores inflamatorios y anabólicos relacionados con la etiopatogenia de la OH.
- La potenciación de los marcadores inflamatorios y anabólicos claves para el desarrollo de la OH en respuesta a un estímulo inflamatorio externo se produce de manera independiente de MyD88.
- Los pacientes en alto riesgo de padecer OH presentan un mayor potencial osteoinductivo sérico en relación a los de menor riesgo.
- Conclusión afectada por la protección de derechos.
- La TT, compuesta por dexametasona, indometacina y pioglitazona, se postula como una terapia preventiva efectiva frente a la OHN al reducir en los osteoblastos los marcadores anabólicos e inflamatorios desencadenados por los factores liberados por los astrocitos y los EN.

## CONCLUSIONS

- The co-culture of astrocytes and osteoblasts provides a valid in vitro model for the study of OHN.
- Astrocyte and EN-derived factors present an osteoforming, pro-inflammatory and anti-adipogenic effect able to potentiate osteoblastogenesis.
- The presence of an inflammatory environment promoted by IL1 $\beta$  enhances the inflammatory and anabolic markers related to the etiopathogenesis of OH.
- The potentiation of the key inflammatory and anabolic markers for the development of OH in response to an external inflammatory stimulus occurs in a MyD88-independent manner.
- Patients at high risk of developing OH have higher serum osteoinductive potential compared to those at low risk.
- Conclusion affected by the protection of rights.
- The TT, composed of dexamethasone, indomethacin, and pioglitazone, is postulated as an effective preventive therapy against OHN by reducing the anabolic and inflammatory markers in osteoblasts triggered by astrocyte and EN-released factors.

## **ANEXOS**



## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo I. Índice de figuras
- Anexo II. Índice de tablas
- Anexo III. Listado de proteínas
- Anexo IV. Listado de abreviaturas
- Anexo V. Dictamen del comité de ética



## ANEXO I: ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de la BHE	12
Figura 2. Estructura de un nervio periférico	14
Figura 3. Fases del remodelado óseo	30
Figura 4. Esquema de desarrollo del modelo de cocultivo celular de astrocitos y osteoblastos	60
Figura 5. Esquema de desarrollo del modelo de cultivo celular con el MCA y osteoblastos	62
Figura 6. Esquema de desarrollo del modelo de cocultivo celular de EN y osteoblastos en presencia del MCA	63
Figura 7. Esquema de desarrollo del modelo de cultivo celular con el MCA y osteoblastos en presencia de estímulos inflamatorios	64
Figura 8. Impacto del cocultivo de astrocitos-osteoblastos en la osteoblastogénesis	86
Figura 9. Efecto del MCA sobre el anabolismo óseo en el proceso de osteoblastogénesis	90
Figura 10. Efecto del MCA sobre el perfil inflamatorio en la osteoblastogénesis	91
Figura 11. Efecto de la adición de <i>IL1<math>\beta</math></i> sobre los efectos basales del MCA en la osteoblastogénesis	93
Figura 12. Efecto de la adición de LPS sobre los efectos basales del MCA en la osteoblastogénesis	94
Figura 13. Cambios morfológicos producidos por el MCA sobre los osteoblastos	96
Figura 14. Efecto del MCA sobre la adipogénesis. Estudio de marcadores adipogénicos	97
Figura 15. Efecto del MCA en la acumulación lipídica de células C3H10T1/2 diferenciadas a adipocito	98
Figura 16. Efecto del MCA sobre la adipogénesis. Estudio de marcadores relacionados con el metabolismo óseo	99

Figura 17. Efecto del MCA sobre la adipogénesis. Estudio de marcadores inflamatorios	100
Figura 18. Efecto del MCA sobre la adipogénesis. Estudio de la viabilidad	101
Figura 19. Efecto de los EN en la osteoblastogénesis	105
Figura 20. Efecto de las CEN en la osteoblastogénesis	109
Figura 21. Efecto del MCA sobre el cocultivo de EN y osteoblastos	113
Figura 22. Efecto del MCEN sobre la adipogénesis	116
Figura 23. Afectada por la protección de derechos	118
Figura 24. Afectada por la protección de derechos	119
Figura 25. Afectada por la protección de derechos	121
Figura 26. Afectada por la protección de derechos	122
Figura 27. Afectada por la protección de derechos	126
Figura 28. Afectada por la protección de derechos	127
Figura 29. Afectada por la protección de derechos	132
Figura 30. Afectada por la protección de derechos	135
Figura 31. Afectada por la protección de derechos	136
Figura 32. Afectada por la protección de derechos	140
Figura 33. Parcialmente afectada por la protección de derechos	145
Figura 34. Parcialmente afectada por la protección de derechos	149

## ANEXO II: ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hormonas y factores reguladores del remodelado óseo	29
Tabla 2. Prevalencia de la OH en relación con el mecanismo lesional	32
Tabla 3. Clasificación de la OH de cadera según Brooker	37
Tabla 4. Clasificación de la OH de codo según Hastings y Graham	37
Tabla 5. Momento óptimo de resección de masas óseas ectópicas en función de su etiología y tiempo transcurrido tras el incidente	44
Tabla 6. Criterios de inclusión y selección muestral	51
Tabla 7. Aspectos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en cada grupo muestral	52
Tabla 8. Caracterización morfológica al microscopio de las células de Schwann y fibroblastos procedentes de un nervio periférico	57
Tabla 9. Composición de los medios de diferenciación de las líneas celulares SaOS2, C3H10T1/T2 y ATDC5	59
Tabla 10. Listado de cebadores humanos usados en la técnica de PCR en tiempo real	71
Tabla 11. Listado de cebadores de ratón usados en la técnica de PCR en tiempo real	72
Tabla 12. Listado de líneas celulares, anticuerpos y reactivos	76

### ANEXO III: LISTADO DE PROTEÍNAS

Medio	Código	Acrónimo	Definición
<b>MCA</b>	-	-	Afectada por la protección de derechos
	P12109	COL61A	Colágeno tipo VI
	P02771	AFP	Fetoproteína alfa
	P05546	SERPIND1	Miembro 1 de la familia D de las serpinas
<b>MCEN</b>	Q9UH99	SUN2	Proteína 2 con dominio SUN
	P01033	TIMP1	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1
	Q15365	PCBP1	Proteína de unión a poly(rC) 1
	Q8NHW5	RPLP0P6	Proteína similar a la subunidad P0 de la subunidad ribosómica 60S
	P01714	IGLV3-19	Región variable 3-19 de la cadena ligera de la inmunoglobulina
	P07339	CTSD	Catepsina D
	P01766	IGHV3-13	Región variable 3-13 de la cadena pesada de la inmunoglobulina
	-	-	Afectada por la protección de derechos
	P05164	MPO	Mieloperoxidasa
	P07358	C8B	Cadena beta del compuesto C8 del complemento
	O14818	PSMA7	Subunidad alfa 7 del proteasoma 20S
	Q9UJU6	DBNL	Proteína tipo debrina
	P29401	TKT	Transcelotasa
	P0DOX5	IGG1	Cadena pesada gamma 1 de la inmunoglobulina
	P63104	YWHAZ	Proteína 14-3-3 zeta/delta
P08697	SERPINF2	Miembro 2 de la familia F de las serpinas	

Medio	Código	Acrónimo	Definición
<b>MCEN</b>	O95497	VNN1	Molécula no inflamatoria vascular 1
	P62937	PPIA	Peptidilprolil isomerasa A
	P50990	CCT8	Subunidad zeta de la proteína 1 del complejo T
	P07355	ANXA2	Anexina A2
	P01591	JCHAIN	Cadena de unión de IgA e IgM multiméricas
	P23284	PPIB	Peptidilprolil isomerasa B
	Q9H0U4	RAB1B	Proteína relacionada con Ras Rab-1B
	P13796	LCP1	Proteína citosólica de linfocitos 1
	P02654	APOC1	Apolipoproteína C1
	P52363	UL87	Proteína UL87
	Q96PD5	PGLYRP2	Proteína de reconocimiento de peptidoglicano 2
	P35579	MYH9	Cadena pesada de la miosina 9
	P52209	PGD	Fosfogluconato deshidrogenasa
	Q9NZN3	EHD3	Proteína con dominio EH 3
	Q13576	IQGAP2	Proteína con dominio IQ similar al activador de la GTPasa Ras
	Q15942	ZYX	Zixina
P55072	VCP	ATPasa del retículo endoplasmático transicional	

## ANEXO IV: LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ALP	Fosfatasa alcalina
ARN	Ácido ribonucleico
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BHE	Barrera hematoencefálica
BHN	Barrera hematonerviosa
BMPs	Proteínas morfogénicas óseas
CEBP	Proteína de unión al potenciador CCAAT
CEN	Células procedentes de los explantes nerviosos
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
DKK1	Dickkopf 1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EN	Explantos nerviosos
FBS	Suero fetal bovino
FDR	Tasa de descubrimientos falsos
FGFs	Factores de crecimiento fibroblásticos
FHL	Fractura de hueso largo
FOP	Fibrodisplasia osificante progresiva
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GH	Hormona de crecimiento
GSK3 $\beta$	Glucógeno-sintasa-quinasa 3
HIF	Factores inducibles por la hipoxia
HOP	Heteroplasia ósea progresiva
IGFs	Factores de crecimiento insulínico
Ihh	Indian hedgehog
IL1	Interleuquina 1
IL1 $\beta$	Interleuquina 1 beta
IL6	Interleuquina 6
ITIH4	Inter-alfa-tripsina de cadena pesada 4
LPS	Lipopolisacárido
MCA	Medio condicionado por los astrocitos

MCEN	Medio condicionado por los explantes nerviosos
MCP1 o CCL2	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MCSF	Factor estimulante de colonias 1
MD	Medio de diferenciación de SaOS2
MMP13	Metaloproteinasa de matriz 13
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MN	Medio de nervio
MSCs	Células madre mesenquimales
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difenilte-trazol
OH	Osificación heterotópica
OHN	Osificación heterotópica neurogénica
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PPARG	Receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma
PTH	Hormona paratiroidea
RANKL	Ligando del factor nuclear kappa B
RT	Retrotranscripción
RUNX2	Factor de transcripción relacionado con RUNT tipo 2
SDS	Dodecil sulfato sódico
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SOST	Esclerostina
SOX9	Factor de transcripción de la región determinante del sexo Y-box-9
SPP1	Osteopontina
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TT	Triterapia
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Wnt

Vía Wingless/Integrated

# ANEXO V: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA



Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es



## DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 22 de mayo de 2017 el estudio:

**Título:** Búsqueda de factores solubles implicados en la osificación heterotópica asociada al traumatismo craneoencefálico

**Promotor:** Rodolfo Gómez Bahamonde

**Tipo de estudio:** Outros

**Versión:** Versión 1.0

**Código del Promotor:**

**Código de Registro:** 2017/262

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humana, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Postautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07/2004, de investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del estudio **por el/la investigador/a del centro:**

Centros	Investigadores Principales
IDIS-CHUS	Rodolfo Gómez Bahamonde

En Santiago de Compostela, a 29 de mayo 2017.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



Guillermo José Prada Ramallal



## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Haines DE. Principios de Neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas [Internet]. 2013. 504 p. Available from: [https://books.google.com/books?id=oLVKDXJx\\_UoC&pgis=1](https://books.google.com/books?id=oLVKDXJx_UoC&pgis=1)
2. Alves de Lima K, Rustenhoven J, Kipnis J. Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 6];38:597–620. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32340575>
3. Rua R, McGavern DB. Advances in Meningeal Immunity. *Trends Mol Med* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 6];24(6):542–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29731353>
4. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2015 Jan 5 [cited 2022 Jul 6];7(1):a020412. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25561720>
5. von Bernhardt R, Eugenín-von Bernhardt J, Flores B, Eugenín León J. Glial Cells and Integrity of the Nervous System. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jul 5];949:1–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27714682>
6. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2006 Jan [cited 2022 Jul 6];7(1):41–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371949>
7. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 6];135(3):311–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29411111>
8. Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 6];217(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32211826>
9. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 5];362(6411):181–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30309945>
10. Catala M, Kubis N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handb Clin Neurol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jul 6];115:29–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931773>
11. Jakob MO, Kofoed-Branzk M, Deshpande D, Murugan S, Klose CSN. An Integrated View on Neuronal Subsets in the Peripheral Nervous

- System and Their Role in Immunoregulation. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 7];12:679055. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34322118>
12. Jortner BS. Common Structural Lesions of the Peripheral Nervous System. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 7];48(1):96–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30722748>
  13. Ubogu EE. Biology of the human blood-nerve barrier in health and disease. *Exp Neurol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 6];328:113272. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32142802>
  14. Jortner BS. Preparation and analysis of the peripheral nervous system. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2022 Jul 7];39(1):66–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21078921>
  15. Maiuolo J, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Nucera S, Macrì R, et al. The Role of Endothelial Dysfunction in Peripheral Blood Nerve Barrier: Molecular Mechanisms and Pathophysiological Implications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jun 20 [cited 2022 Jul 6];20(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31226852>
  16. Gugala Z, Olmsted-Davis EA, Xiong Y, Davis EL, Davis AR. Trauma-Induced Heterotopic Ossification Regulates the Blood-Nerve Barrier. *Front Neurol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 6];9:408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29922221>
  17. Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2004 Oct [cited 2022 Jul 5];36(10):1861–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15203098>
  18. Gaudet AD, Fonken LK. Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 5];15(3):554–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29728852>
  19. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jul 12];6:121–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936937>
  20. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Aug 13 [cited 2022 Jul 12];285(33):25103–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501658>
  21. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)* [Internet]. 2016 May [cited 2022 Jul 12];31(3):233–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27053737>
  22. Tobeiha M, Moghadasian MH, Amin N, Jafarnejad S. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Biomed Res Int* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 12];2020:6910312. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32149122>
23. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2008 May 15 [cited 2022 Jul 12];473(2):139–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395508>
  24. Buck DW, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(6):1314–20.
  25. Marx RE. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* [Internet]. 2007 Nov [cited 2022 Jul 12];19(4):455–66, v. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088897>
  26. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone* [Internet]. 2015 Nov [cited 2022 Jul 14];80:14–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453494>
  27. Bethel M, Chitteti BR, Srouf EF, Kacena MA. The Changing Balance Between Osteoblastogenesis and Adipogenesis in Aging and its Impact on Hematopoiesis. *Curr Osteoporos Rep* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jul 19];11(2):99. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3643998/>
  28. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2022 Jul 19];4(3):290–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471489204000621>
  29. Li J, Liu X, Zuo B, Zhang L. The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Aging Dis* [Internet]. 2016 Aug [cited 2022 Jul 19];7(4):514–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27493836>
  30. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2022 Jul 19];5(8):442–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581903>
  31. McKee MD, Pedraza CE, Kaartinen MT. Osteopontin and wound healing in bone. *Cells Tissues Organs* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jul 12];194(2–4):313–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576907>
  32. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2022 Jul 14];5(1):a008334. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284041>
  33. Ghimire S, Miramini S, Edwards G, Rotne R, Xu J, Ebeling P, et al. The investigation of bone fracture healing under intramembranous and

- endochondral ossification. *Bone reports* [Internet]. 2021 Jun [cited 2022 Jul 14];14:100740. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33385019>
34. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2010 [cited 2020 Jan 22];12(5):216. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar3117>
  35. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2012 Jan 31 [cited 2022 Jul 18];8(3):133–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22293759>
  36. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* [Internet]. 2013 Feb 6 [cited 2022 Jul 19];19(2):179–92. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.3074>
  37. Escobar-Gómez F, Jódar E, Hawkins F. Receptor Wnt: fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. *Rev Española Enfermedades Metabólicas Óseas* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2022 Jul 19];18(2):39–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1132846009720537>
  38. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* [Internet]. 2008 Apr [cited 2022 Jul 19];4(2):68–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279717>
  39. Velasco J, Riancho JA. La vía Wnt y el hueso. *Rev Española Enfermedades Metabólicas Óseas* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2022 Jul 19];17(1):5–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1132846008711310>
  40. Ranganathan K, Loder S, Agarwal S, Wong VW, Wong VC, Forsberg J, et al. Heterotopic Ossification: Basic-Science Principles and Clinical Correlates. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2022 Jul 21];97(13):1101–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26135077>
  41. Shehab D, Elgazzar AH, Collier BD. Heterotopic ossification. *J Nucl Med* [Internet]. 2002 Mar [cited 2022 Jul 21];43(3):346–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884494>
  42. McCarthy EF, Sundaram M. Heterotopic ossification: a review. *Skeletal Radiol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2022 Jul 21];34(10):609–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16132978>
  43. Meyers C, Lisiecki J, Miller S, Levin A, Fayad L, Ding C, et al. Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review. *JBMR Plus* [Internet]. 2019 Apr 27 [cited 2022 Aug 1];3(4):e10172. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm4.10172>
  44. R X, J H, X Z, Y Y. Heterotopic ossification: Mechanistic insights and

- clinical challenges. *Bone* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 21];109. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28855144/>
45. Dejerne A CA. Para-osteo-arthropaties des paraplegiques par lesion medullaire; etude clinique et radiographique. *Ann Med*. 1918;5(497).
  46. Łęgosz P, Otworowski M, Sibilska A, Starszak K, Kotrych D, Kwapisz A, et al. Heterotopic Ossification: A Challenging Complication of Total Hip Arthroplasty: Risk Factors, Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jul 21];2019:3860142. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31119167>
  47. Mujtaba B, Taher A, Fiala MJ, Nassar S, Madewell JE, Hanafy AK, et al. Heterotopic ossification: radiological and pathological review. *Radiol Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jul 21];53(3):275–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31553710>
  48. Sullivan MP, Torres SJ, Mehta S, Ahn J. Heterotopic ossification after central nervous system trauma: A current review. *Bone Joint Res* [Internet]. 2013 Mar [cited 2022 Jul 26];2(3):51–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610702>
  49. Sakellariou VI, Grigoriou E, Mavrogenis AF, Soucacos PN, Papagelopoulos PJ. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact* [Internet]. 2012 Dec [cited 2022 Jul 21];12(4):230–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23196266>
  50. Eghbali-Fatourehchi GZ, Mödder UIL, Charatcharoenwittaya N, Sanyal A, Undale AH, Clowes JA, et al. Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone* [Internet]. 2007 May [cited 2022 Aug 4];40(5):1370–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320497>
  51. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 May 12 [cited 2022 Aug 4];352(19):1959–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15888696>
  52. Ampadiotaki M-M, Evangelopoulos DS, Pallis D, Vlachos C, Vlamis J, Evangelopoulos M-E. New Strategies in Neurogenic Heterotopic Ossification. *Cureus* [Internet]. 2021 Apr 27 [cited 2022 Jul 21];13(4):e14709. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34055549>
  53. Dey D, Wheatley BM, Cholok D, Agarwal S, Yu PB, Levi B, et al. The traumatic bone: trauma-induced heterotopic ossification. *Transl Res* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 21];186:95–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28668522>
  54. Salisbury E, Sonnet C, Heggeness M, Davis AR, Olmsted-Davis E. Heterotopic ossification has some nerve. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*

- [Internet]. 2010 [cited 2022 Jul 21];20(4):313–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395504>
55. Davis EL, Davis AR, Gugala Z, Olmsted-Davis EA. Is heterotopic ossification getting nervous?: The role of the peripheral nervous system in heterotopic ossification. *Bone* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 21];109:22–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28716552>
  56. Lazard ZW, Olmsted-Davis EA, Salisbury EA, Gugala Z, Sonnet C, Davis EL, et al. Osteoblasts Have a Neural Origin in Heterotopic Ossification. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2015 Sep [cited 2022 Aug 4];473(9):2790–806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944403>
  57. Brady RD, Shultz SR, McDonald SJ, O'Brien TJ. Neurological heterotopic ossification: Current understanding and future directions. *Bone* [Internet]. 2018 [cited 2022 Aug 3];109:35–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28526267>
  58. Kaplan FS, Craver R, Macewen GD, Gannon FH, Finkel G, Hahn G, et al. previously reported cases heterotopic ossification. Two new case reports and follow-up of three Progressive osseous heteroplasia: a distinct developmental disorder of [Internet]. Vol. 76, This is an enhanced PDF from *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 1994 [cited 2022 Aug 1]. Available from: [www.jbjs.org](http://www.jbjs.org)
  59. van Kuijk A, Geurts A, van Kuppevelt H. Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury. *Spinal Cord* [Internet]. 2002 Jul 21 [cited 2022 Jul 28];40(7):313–26. Available from: <http://www.nature.com/articles/3101309>
  60. Huang H, Cheng W-X, Hu Y-P, Chen J-H, Zheng Z-T, Zhang P. Relationship between heterotopic ossification and traumatic brain injury: Why severe traumatic brain injury increases the risk of heterotopic ossification. *J Orthop Transl* [Internet]. 2018 Jan [cited 2022 Jul 21];12:16–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29662775>
  61. Debaud C, Salga M, Begot L, Holy X, Chedik M, de l'Escalopier N, et al. Peripheral denervation participates in heterotopic ossification in a spinal cord injury model. *PLoS One* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 21];12(8):e0182454. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28854256>
  62. Kurer MH, Khoker MA, Dandona P. Human osteoblast stimulation by sera from paraplegic patients with heterotopic ossification. *Paraplegia* [Internet]. 1992 Mar [cited 2022 Aug 1];30(3):165–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1630841>
  63. Cadosch D, Gautschi OP, Thyer M, Song S, Skirving AP, Filgueira L, et al. Humoral factors enhance fracture-healing and callus formation in

- patients with traumatic brain injury. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2009 Feb [cited 2022 Aug 1];91(2):282–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181971>
64. Cadosch D, Toffoli AM, Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R, Skirving AP, et al. Serum after traumatic brain injury increases proliferation and supports expression of osteoblast markers in muscle cells. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2010 Mar [cited 2022 Aug 1];92(3):645–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194323>
  65. Gautschi OP, Cadosch D, Frey SP, Skirving AP, Filgueira L, Zellweger R. Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients. *ANZ J Surg* [Internet]. 2009 Jun [cited 2022 Aug 4];79(6):449–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19566868>
  66. Heffner MA, Anderson MJ, Yeh GC, Genetos DC, Christiansen BA. Altered Bone Development in a Mouse Model of Peripheral Sensory Nerve Inactivation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 1];14(1):1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4123540/>
  67. Offley SC, Guo T-Z, Wei T, Clark JD, Vogel H, Lindsey DP, et al. Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2005 Feb [cited 2022 Aug 1];20(2):257–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647820>
  68. Madsen JE, Hukkannen M, Aune AK, Basran I, Moller JF, Polak JM, et al. Fracture Healing and Callus Innervation After Peripheral Nerve Resection in Rats. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 4];351:230–40. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Lars-Nordsletten/publication/13637533\\_Fracture\\_Healing\\_and\\_Callus\\_Innervation\\_After\\_Peripheral\\_Nerve\\_Resection\\_in\\_Rats/links/5c7e257892851c695054e229/Fracture-Healing-and-Callus-Innervation-After-Peripheral-Nerve-Resec](https://www.researchgate.net/profile/Lars-Nordsletten/publication/13637533_Fracture_Healing_and_Callus_Innervation_After_Peripheral_Nerve_Resection_in_Rats/links/5c7e257892851c695054e229/Fracture-Healing-and-Callus-Innervation-After-Peripheral-Nerve-Resec)
  69. Ikeda K, Osamura N, Kasashima S. Ossified median nerve schwannoma: a case report. *Hand Surg* [Internet]. 2012 [cited 2022 Aug 3];17(3):371–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23061948>
  70. Olmsted-Davis EA, Salisbury EA, Hoang D, Davis EL, Lazard Z, Sonnet C, et al. Progenitors in Peripheral Nerves Launch Heterotopic Ossification. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 Aug 4];6(4):1109–19. Available from: <https://academic.oup.com/stcltm/article/6/4/1109/6404772>
  71. Gugala Z, Olmsted-Davis EA, Xiong Y, Davis EL, Davis AR. Trauma-Induced Heterotopic Ossification Regulates the Blood-Nerve Barrier. *Front Neurol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Aug 3];9:408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29922221>

72. Coons D, Godleski M. Range of motion exercises in the setting of burn-associated heterotopic ossification at the elbow: case series and discussion. *Burns* [Internet]. 2013 Jun [cited 2022 Jul 26];39(4):e34-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23159702>
73. Holavanahalli RK, Helm PA, Parry IS, Dolezal CA, Greenhalgh DG. Select practices in management and rehabilitation of burns: a survey report. *J Burn Care Res* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jul 26];32(2):210–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21240002>
74. Agarwal S, Loder S, Levi B. Heterotopic Ossification Following Upper Extremity Injury. *Hand Clin* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 27];33(2):363–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28363301>
75. Iaccarino MA, Bhatnagar S, Zafonte R. Rehabilitation after traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jul 27];127:411–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25702231>
76. Shimono K, Tung W-E, Macolino C, Chi AH-T, Didizian JH, Mundy C, et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor- $\gamma$  agonists. *Nat Med* [Internet]. 2011 Apr [cited 2022 Jul 26];17(4):454–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460849>
77. Lees-Shepard JB, Nicholas S-AE, Stoessel SJ, Devarakonda PM, Schneider MJ, Yamamoto M, et al. Palovarotene reduces heterotopic ossification in juvenile FOP mice but exhibits pronounced skeletal toxicity. *Elife* [Internet]. 2018 Sep 18 [cited 2022 Sep 20];7. Available from: <https://elifesciences.org/articles/40814>
78. CCF-STTG1 | cryopreserved culture | 300388 [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://cls.shop/CCF-STTG1/300388>
79. SaOS-2 | cryopreserved culture | 300331 [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://cls.shop/SaOS-2/300331>
80. C3H/10T1/2, Clone 8 - CCL-226 | ATCC [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-226>
81. Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C. Establishment and Characterization of a Cloned Line of C3H Mouse Embryo Cells Sensitive to Postconfluence Inhibition of Division. *Cancer Res* [Internet]. 1973 Dec 1 [cited 2022 Aug 9];33(12):3231–8. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/33/12/3231/479278/Establishment-and-Characterization-of-a-Cloned>
82. Zhao L, Li G, Chan K-M, Wang Y, Tang P-F. Comparison of Multipotent Differentiation Potentials of Murine Primary Bone Marrow Stromal Cells and Mesenchymal Stem Cell Line C3H10T1/2. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2009 Jan 4 [cited 2022 Aug 9];84(1):56–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00223-008-9189-3>

83. CELL SEARCH SYSTEM -CELL BANK- (RIKEN BRC) [RCB0565 : ATDC5] [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: [https://cellbank.brc.riken.jp/cell\\_bank/CellInfo/?cellNo=RCB0565](https://cellbank.brc.riken.jp/cell_bank/CellInfo/?cellNo=RCB0565)
84. Newton PT, Staines KA, Spevak L, Boskey AL, Teixeira CC, Macrae VE, et al. Chondrogenic ATDC5 cells: an optimised model for rapid and physiological matrix mineralisation. *Int J Mol Med* [Internet]. 2012 Nov [cited 2022 Aug 9];30(5):1187–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941229>
85. Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci* [Internet]. 1991 Aug [cited 2022 Aug 9];11(8):2433–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1869923>
86. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983 Dec 16 [cited 2022 Aug 10];65(1–2):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
87. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* [Internet]. 1986 May 22 [cited 2022 Aug 10];89(2):271–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175986903686>
88. Pathan M, Keerthikumar S, Chisanga D, Alessandro R, Ang C, Askenase P, et al. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Aug 17];6(1):1321455. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/20013078.2017.1321455>
89. Jho E, Zhang T, Domon C, Joo C-K, Freund J-N, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Feb [cited 2022 Sep 29];22(4):1172–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809808>
90. Shao Z, Wang G, Yi X, Wang P. An Intracranial Gliosis Mimicking Neoplasm: A Dilemma. *Iran J Radiol* [Internet]. 2016 Apr 27 [cited 2022 Oct 3];13(2). Available from: <https://brief.land/iranradiol/articles/18005.html>
91. Kolar K, Freitas-Andrade M, Bechberger JF, Krishnan H, Goldberg GS, Naus CC, et al. Podoplanin: a marker for reactive gliosis in gliomas and brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2022 Oct 3];74(1):64–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470350>
92. Rivera-Zengotita M, Yachnis AT. Gliosis versus glioma?: don't grade until you know. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2022 Oct

- 3];19(4):239–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22692287>
93. Zarb Y, Weber-Stadlbauer U, Kirschenbaum D, Kindler DR, Richetto J, Keller D, et al. Ossified blood vessels in primary familial brain calcification elicit a neurotoxic astrocyte response. *Brain* [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 4];142(4):885–902. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30805583>
  94. Kan C, Chen L, Hu Y, Ding N, Lu H, Li Y, et al. Conserved signaling pathways underlying heterotopic ossification. *Bone* [Internet]. 2018 [cited 2022 Oct 4];109:43–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28455214>
  95. Reactome | SPP1 (osteopontin) binds CD44 [Internet]. [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-2752115>
  96. Yim A, Smith C, Brown AM. Osteopontin/secreted phosphoprotein-1 harnesses glial-, immune-, and neuronal cell ligand-receptor interactions to sense and regulate acute and chronic neuroinflammation. *Immunol Rev* [Internet]. 2022 Oct 22 [cited 2022 Oct 12];311(1):224–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.13081>
  97. Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R, Li IW, et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1995 Apr 21 [cited 2022 Oct 12];760:223–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7785896>
  98. Näpänkangas J, Ohtonen P, Ohukainen P, Weisell J, Väisänen T, Peltonen T, et al. Increased mesenchymal podoplanin expression is associated with calcification in aortic valves. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 28];39:30–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30616084>
  99. Cimini M, Kishore R. Role of Podoplanin-Positive Cells in Cardiac Fibrosis and Angiogenesis After Ischemia. *Front Physiol* [Internet]. 2021 Apr 12 [cited 2022 Oct 28];12:442. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.667278/full>
  100. Nahar K, Lebouvier T, Andaloussi Mäe M, Konzer A, Bergquist J, Zarb Y, et al. Astrocyte-microglial association and matrix composition are common events in the natural history of primary familial brain calcification. *Brain Pathol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 28];30(3):446–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31561281>
  101. Convente MR, Wang H, Pignolo RJ, Kaplan FS, Shore EM. The immunological contribution to heterotopic ossification disorders. *Curr Osteoporos Rep* [Internet]. 2015 Apr [cited 2022 Oct 6];13(2):116–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687936>
  102. Kaplan FS, Pignolo RJ, Shore EM. Granting immunity to FOP and catching heterotopic ossification in the Act. *Semin Cell Dev Biol*

- [Internet]. 2016 Jan [cited 2022 Oct 6];49:30–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26706149>
103. Kraft CT, Agarwal S, Ranganathan K, Wong VW, Loder S, Li J, et al. Trauma-induced heterotopic bone formation and the role of the immune system: A review. *J Trauma Acute Care Surg* [Internet]. 2016 Jan [cited 2022 Oct 6];80(1):156–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491794>
  104. Tseng H-W, Kulina I, Girard D, Gueguen J, Vaquette C, Salga M, et al. Interleukin-1 is overexpressed in injured muscles following spinal cord injury and promotes neurogenic heterotopic ossification. *bioRxiv* [Internet]. 2021 Oct 19 [cited 2022 Oct 5];2021.10.19.464906. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.19.464906v1.full.pdf+html>
  105. Li J, Sun Z, Luo G, Wang S, Cui H, Yao Z, et al. Quercetin Attenuates Trauma-Induced Heterotopic Ossification by Tuning Immune Cell Infiltration and Related Inflammatory Insult. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 5];12:649285. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34093537>
  106. Haviv R, Moshe V, De Benedetti F, Prencipe G, Rabinowicz N, Uziel Y. Is fibrodysplasia ossificans progressiva an interleukin-1 driven auto-inflammatory syndrome? *Pediatr Rheumatol* [Internet]. 2019 Dec 21 [cited 2022 Oct 5];17(1):84. Available from: <https://ped-rheum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12969-019-0386-6>
  107. Huang AY, Shu L, Chen Z, Zhang C. IL-6 is involved in thoracic ossification of the ligamentum flavum. *PLoS One* [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 5];17(7):e0272357. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35905126>
  108. Huang Y, Wang X, Zhou D, Zhou W, Dai F, Lin H. Macrophages in heterotopic ossification: from mechanisms to therapy. *NPJ Regen Med* [Internet]. 2021 Oct 26 [cited 2022 Oct 5];6(1):70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34702860>
  109. Sorkin M, Huber AK, Hwang C, Carson WF, Menon R, Li J, et al. Regulation of heterotopic ossification by monocytes in a mouse model of aberrant wound healing. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 5 [cited 2022 Oct 5];11(1):722. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-019-14172-4>
  110. Yang S-K, Wang Y-C, Chao C-C, Chuang Y-J, Lan C-Y, Chen B-S. Dynamic cross-talk analysis among TNF-R, TLR-4 and IL-1R signalings in TNFalpha-induced inflammatory responses. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2010 May 24 [cited 2022 Oct 6];3:19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497537>
  111. Blanco AM, Vallés SL, Pascual M, Guerri C. Involvement of TLR4/type

- I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol* [Internet]. 2005 Nov 15 [cited 2022 Oct 6];175(10):6893–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272348>
112. He X, Qian Y, Li Z, Fan EK, Li Y, Wu L, et al. TLR4-Upregulated IL-1 $\beta$  and IL-1RI Promote Alveolar Macrophage Pyroptosis and Lung Inflammation through an Autocrine Mechanism. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Oct 16 [cited 2022 Oct 6];6(1):31663. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep31663>
  113. Bohic S, Rohanizadeh R, Touchais S, Godard A, Daculsi G, Heymann D. Leukemia inhibitory factor and oncostatin M influence the mineral phases formed in a murine heterotopic calcification model: a Fourier transform-infrared microspectroscopic study. *J Bone Miner Res* [Internet]. 1998 Oct [cited 2022 Oct 5];13(10):1619–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9783551>
  114. Metcalf D, Gearing DP. Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1989 Aug [cited 2022 Oct 5];86(15):5948–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2569739>
  115. Noda M, Vogel RL, Hasson DM, Rodan GA. Leukemia inhibitory factor suppresses proliferation, alkaline phosphatase activity, and type I collagen messenger ribonucleic acid level and enhances osteopontin mRNA level in murine osteoblast-like (MC3T3E1) cells. *Endocrinology* [Internet]. 1990 Jul [cited 2022 Oct 5];127(1):185–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113864>
  116. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2015 Oct [cited 2022 Oct 5];26(5):533–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26187859>
  117. Sims NA, Johnson RW. Leukemia inhibitory factor: a paracrine mediator of bone metabolism. *Growth Factors* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Oct 5];30(2):76–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22304408>
  118. Ravandi F, Estrov Z. THE ROLE OF LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR IN CANCER AND CANCER METASTASIS [Internet]. 2001 [cited 2022 Oct 5]. Available from: [https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/0-306-48399-8\\_1.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/0-306-48399-8_1.pdf)
  119. van Tuyl LHD, Voskuyl AE, Boers M, Geusens P, Landewé RBM, Dijkmans BAC, et al. Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2010 Sep [cited 2022 Oct 7];69(9):1623–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525836>
  120. Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology.

- Rev Endocr Metab Disord [Internet]. 2015 Jun [cited 2022 Oct 7];16(2):131–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557611>
121. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen* [Internet]. 2020 Dec 7 [cited 2022 Oct 7];40(1):2. Available from: <https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-019-0111-3>
122. Shao X, Wang M, Wei X, Deng S, Fu N, Peng Q, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ : Master Regulator of Adipogenesis and Obesity. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2016 [cited 2022 Oct 12];11(3):282–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018229>
123. Pignolo RJ, Xu M, Russell E, Richardson A, Kaplan J, Billings PC, et al. Heterozygous inactivation of *Gnas* in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2011 Nov [cited 2022 Oct 10];26(11):2647–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21812029>
124. Alkhuzaei FM, Alsairafi R, Alqurashi KM, Al-Zaidi RS. Panniculitis Ossificans in Posterior Knee: An Unusual Presentation. *Cureus* [Internet]. 2021 Nov [cited 2022 Oct 10];13(11):e19369. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34786273>
125. Elli FM, Boldrin V, Pirelli A, Spada A, Mantovani G. The Complex *GNAS* Imprinted Locus and Mesenchymal Stem Cells Differentiation. *Horm Metab Res* [Internet]. 2017 Apr [cited 2022 Oct 10];49(4):250–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27756094>
126. Schrandt DE, Welting TJ, Caron MMJ, Schrandt JJP, van Rhijn LW, Körper-Keularts I, et al. Endochondral ossification in a case of progressive osseous heteroplasia in a young female child. *J Pediatr Orthop B* [Internet]. 2014 Sep [cited 2022 Oct 10];23(5):477–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626099>
127. Lotta S, Scelsi L, Scelsi R. Microvascular changes in the lower extremities of paraplegics with heterotopic ossification. *Spinal Cord* [Internet]. 2001 Nov [cited 2022 Oct 10];39(11):595–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641810>
128. Mushtaq T, Ahmed SF. The impact of corticosteroids on growth and bone health. *Arch Dis Child* [Internet]. 2002 Aug [cited 2022 Oct 12];87(2):93–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12138051>
129. Ward WE, Donovan SM, Atkinson SA. Dexamethasone-Induced Abnormalities in Growth and Bone Metabolism in Piglets Are Partially Attenuated by Growth Hormone with No Synergistic Effect of Insulin-

- Like Growth Factor-I. *Pediatr Res* [Internet]. 1998 Aug [cited 2022 Oct 12];44(2):215–21. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1203/00006450-199808000-00013>
130. Sagi HC, Jordan CJ, Barei DP, Serrano-Riera R, Steverson B. Indomethacin prophylaxis for heterotopic ossification after acetabular fracture surgery increases the risk for nonunion of the posterior wall. *J Orthop Trauma* [Internet]. 2014 Jul [cited 2022 Oct 12];28(7):377–83. Available from: <https://journals.lww.com/00005131-201407000-00001>
  131. Al Farii H, Farahdel L, Frazer A, Salimi A, Bernstein M. The effect of NSAIDs on postfracture bone healing: a meta-analysis of randomized controlled trials. *OTA Int open access J Orthop trauma* [Internet]. 2021 Jun [cited 2022 Oct 12];4(2):e092. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/OI9.0000000000000092>
  132. Viscoli CM, Inzucchi SE, Young LH, Insogna KL, Conwit R, Furie KL, et al. Pioglitazone and Risk for Bone Fracture: Safety Data From a Randomized Clinical Trial. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2022 Oct 12];102(3):914. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460686/>
  133. Mori H, Okada Y, Tanaka Y. The Effects of Pioglitazone on Bone Formation and Resorption Markers in Type 2 Diabetes Mellitus. *Intern Med* [Internet]. 2017 Jun 6 [cited 2022 Oct 12];56(11):1301–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28566590>
  134. Meier C, Kraenzlin ME, Bodmer M, Jick SS, Jick H, Meier CR. Use of Thiazolidinediones and Fracture Risk. *Arch Intern Med* [Internet]. 2008 Apr 28 [cited 2022 Oct 12];168(8):820. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.168.8.820>
  135. Hamidouche Z, Haÿ E, Vaudin P, Charbord P, Schüle R, Marie PJ, et al. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB J* [Internet]. 2008 Nov [cited 2022 Oct 11];22(11):3813–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653765>
  136. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2013 Dec 30 [cited 2022 Oct 11];4(5):117. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/scrt328>
  137. Spiro AS, Beil FT, Timo Beil F, Schinke T, Schilling AF, Eulenburg C, et al. Short-term application of dexamethasone enhances bone morphogenetic protein-7-induced ectopic bone formation in vivo. *J Trauma* [Internet]. 2010 Dec [cited 2022 Oct 11];69(6):1473–80.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21150526>
138. Hah Y-S, Joo H-H, Kang Y-H, Park B-W, Hwang S-C, Kim J-W, et al. Cultured Human Periosteal-Derived Cells Have Inducible Adipogenic Activity and Can Also Differentiate Into Osteoblasts in a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Mediated Fashion. *Int J Med Sci* [Internet]. 2014 [cited 2022 Oct 11];11(11):1116–28. Available from: <http://www.medsci.org>1116<http://www.medsci.org>





# MUSCULO- SKELETAL PATHOLOGY

La osificación heterotópica (OH) es la formación de hueso laminar maduro en tejidos blandos extraesqueléticos. Existen dos variantes de OH: la congénita y la adquirida. Dentro de la modalidad adquirida destaca la OH neurogénica (OHN), la cual se desarrolla tras un traumatismo que afecta al Sistema Nervioso Central asociado a una fractura de hueso largo. Clínicamente, no existe ningún signo patognomónico que permita establecer el diagnóstico temprano de la patología. Además, los abordajes terapéuticos actuales son poco efectivos, sujetos a efectos adversos y no aptos para todo tipo de población. Por ello, en esta tesis doctoral se investigan los mecanismos subyacentes a la OHN, así como posibles herramientas terapéuticas para su abordaje.