



Bravo B¹, Fernández de Castro L¹, Buendía I¹, Santos X², Gortázar A¹

¹ Facultad de Medicina. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Universidad CEU San Pablo. Madrid (España)

² Fundación HM Hospitales. Madrid (España)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) regulan la proliferación de células madre mesenquimales humanas

Correspondencia: Arancha Gortázar - Facultad de Medicina - Universidad CEU San Pablo - Avda. Montepríncipe, s/n - 28668 Boadilla del Monte - Madrid (España)

Correo electrónico: argortazar@ceu.es

Fecha de recepción: 16/09/2016

Fecha de aceptación: 20/12/2016

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM recibida para asistir al 36º Congreso de la ASBMR (Houston, 2014).

Resumen

El tejido adiposo contiene un gran número de células madre mesenquimales (*Adipose Stem Cells*, ASCs) que residen en su estroma vascular. Aunque existe controversia acerca de la capacidad de generar tejido óseo de estas células *in vivo*, *in vitro* constituyen un buen modelo de diferenciación osteogénica debido a su semejanza fenotípica con las células estromales de la médula ósea (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSCs) en cultivo. La diferenciación de las poblaciones osteoprogenitoras de la médula ósea está intensamente regulada por factores locales, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), que modulan la proliferación de estas poblaciones en distintos estadios de diferenciación. Tanto el VEGF como el fragmento N-terminal de la PTHrP ejercen efectos osteogénicos. En este estudio hipotetizamos que sus efectos sobre la proliferación celular de los osteoprogenitores son dependientes del estadio de diferenciación osteoblástica. Tras confirmar su capacidad de diferenciación *in vitro* por expresión génica de Runx2 y acumulación de calcio, se analizó la respuesta proliferativa a estímulos con VEGF o PTHrP(1-36) de ASCs sometidas o no a inducción osteogénica. VEGF pero no PTHrP(1-36) estimuló la capacidad proliferativa de las ASCs no inducidas mientras que PTHrP(1-36), pero no VEGF, estimuló la proliferación de las ASCs inducidas, corroborando el papel diferencial de estos factores de crecimiento en distintos estadios de diferenciación.

Palabras clave: células madre mesenquimales adiposas (ASCs), PTHrP, VEGF, diferenciación osteogénica.



Vascular endothelial growth factor (VEGF) and the N-terminal portion of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) regulate the proliferation of human mesenchymal stem cells

Summary

Adipose tissue contains a large number of mesenchymal stem cells (ASCs) residing in their vascular stroma. Although there is controversy regarding the ability to generate bone tissue from these cells *in vivo*, the *in vitro* cells offer a good model of osteogenic differentiation due to its phenotypic similarity with the bone marrow stromal cells (BMSCs) in culture. The differentiation of osteo-progenitor populations of bone marrow is intensely regulated by local factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and parathyroid hormone-related protein (PTHrP), which modulate these populations' proliferation in different stages of differentiation. Both the VEGF and the N-terminal fragment of the PTHrP exert osteogenic effects. In this study, we posited that its effects on proliferation of osteo-progenitors are stage dependent of osteoblastic differentiation. After confirming its capacity to *in vitro* differentiation by Runx2 gene expression and accumulation of calcium, the proliferative response to stimuli was analyzed with VEGF or PTHrP (1-36) of ASCs submitted or not to osteogenic induction. VEGF, but not PTHrP (1-36), stimulated the proliferative capacity of uninduced ASCs, whereas BMSCs, but not VEGF, stimulated the proliferation of induced ASCs, corroborating the differential role of this growth in different stages of differentiation.

Key words: *adipose mesenchymal stem cells (ASCs), PTHrP, VEGF, osteogenic differentiation.*

Introducción

En los años 60, Friedenstein describió por primera vez las células estromales de la médula ósea (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSCs) como células fibroblásticas con adherencia al plástico y capacidad de diferenciación tri-lineal, generando osteoblastos, condroblastos y adipocitos. Una fracción de estas células demostró además capacidad clonogénica cuando éstas se cultivaron en muy baja densidad (*Colony Forming Units-Fibroblast*, CFU-F)¹. Más adelante se observó que esta multipotencialidad es sólo inherente a una pequeña parte de esta población celular heterogénea, correspondiente a las células madre esqueléticas (*Skeletal Stem Cells*, SSCs, por debajo del 0,1% de las BMSCs y alrededor del 12% de las CFU-F), que, además, son las únicas capaces de generar el estroma necesario para la generación de nichos hematopoyéticos en la médula ósea^{2,3}.

El tejido adiposo contiene un gran número de células adherentes, con capacidad de formar CFU-F y muchas otras características que las hacen similares a las BMSCs. En comparación con las BMSCs, este tejido es de fácil acceso, como lipoaspirados descartados en operaciones de liposucción, y el aislamiento de células estromales es relativamente sencillo^{4,5}. De forma similar a las SSCs entre las BMSCs, la fracción estromal vascular del tejido adiposo (SVF) es una población heterogénea de células entre las que se encuentran las ASCs, que presumiblemente se encuentran asociadas de forma similar a las SSCs a la microvasculatura de la grasa⁶, en consonancia con otros tejidos en los que las células madres adultas se encuentran asociadas a la microvasculatura en

forma de pericitos⁷. Aunque diversos autores afirman que las ASCs poseen la capacidad inherente de diferenciarse a células de estirpe ósea, hasta la fecha ningún grupo de investigación ha demostrado que esto sea posible, salvo después de transdiferenciar estas células tras un tratamiento intensivo con BMPs, que ha demostrado ser un potente osteoinductor de diversos tipos celulares⁸. Pese a no haberse demostrado la utilidad clínica de las ASCs para la regeneración ósea, estas células pueden ser un modelo conveniente para estudiar la diferenciación osteoblástica *in vitro*, gracias a su fácil acceso y a su respuesta similar a la de las BMSCs a factores de diferenciación tri-lineal *in vitro*⁹.

En presencia de ácido ascórbico, dexametasona y β glicerol-fosfato las ASC expresan marcadores de diferenciación osteoblástica *in vitro*. Es el caso del sistema formado por la osteoprotegerina (OPG) y el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), proteínas implicadas en el remodelado óseo. RANKL es una proteína de la familia del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que se expresa en la membrana de los osteoblastos, y que a su vez puede ser secretada por éstas¹⁰. Se une al receptor activador para el factor nuclear κ B (RANK) que está presente en precursores osteoclasticos activando su diferenciación y maduración a osteoclastos¹¹. OPG es un receptor señuelo secretado por los osteoblastos que se une a RANKL, impidiendo que éste se una a RANK, bloqueando por tanto la activación de los osteoclastos. Por otro lado, Runx2 es un factor de transcripción clave en la diferenciación de células osteoblásticas¹².



El factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF, es una molécula clave en la regulación de la proliferación de las células endoteliales. Promueve la proliferación, migración y supervivencia de estas células, así como su permeabilidad vascular¹³. La expresión de VEGF y sus receptores en BMSCs ha sido demostrada por diversos estudios en cultivos celulares^{13,14}. Además, *in vitro*, se ha mostrado el papel del receptor VEGFR2 como clave en la diferenciación y supervivencia osteoblástica¹⁵. VEGF induce la diferenciación en cultivos celulares de preosteoblastos¹⁴ y estimula su migración y proliferación^{13,14}. Así, el VEGF parece estar implicado en las etapas tempranas de diferenciación ósea, tanto en la esquelotogénesis –siendo un importante factor en la formación ósea endocondral e intramembranosa– como en homeostasis adulta, promoviendo la diferenciación osteoblástica y reduciendo la diferenciación adipogénica de las BMSCs^{16,17}.

La proteína relacionada con la parathormona (PTH), PTHrP, es una citoquina pleiotrópica con importantes funciones en el tejido óseo¹⁵. Es considerada un modulador del remodelado óseo y un estimulador de la formación de hueso que promueve la diferenciación osteoblástica y su supervivencia¹⁵, siendo por tanto un importante factor de maduración. El procesamiento postraduccional del gen de la PTHrP, genera diferentes fragmentos, entre los que destaca un fragmento N-terminal, PTHrP(1-36), que presenta gran homología con la PTH y que actúa a través del receptor 1 común para PTH/PTHrP, PTH1R¹². La expresión de PTHrP en el linaje osteoblástico disminuye a medida que ésta se va diferenciando²⁰, pero el PTH1R juega un papel fundamental en los osteoblastos maduros y osteocitos, disminuyendo su apoptosis y aumentando su número en osteoblastos del periostio *in vivo*^{18,19}. Estudios previos indican que la PTHrP podría incrementar la proliferación de osteoblastos inmaduros a través de la regulación de Ciclina D1 (promotor) y p27 (inhibidor), ambos reguladores del ciclo celular¹².

En este trabajo hipotetizamos que los efectos de VEGF y PTHrP sobre la proliferación celular de los osteoprogenitores son dependientes del estadio de diferenciación osteoblástica. Así, las poblaciones más indiferenciadas serían más sensibles a VEGF mientras que los progenitores ya comprometidos hacia la diferenciación osteoblástica responderían mejor a PTHrP(1-36). Para ello se utilizaron ASCs humanas procedentes de lipoaspirados como modelo *in vitro* de diferenciación osteogénica. Tras confirmar su capacidad de diferenciación *in vitro* por expresión génica de Runx2 y acumulación de calcio, se analizó la respuesta proliferativa a estímulos con VEGF o PTHrP(1-36) de ASCs sometidas o no a inducción osteogénica. VEGF, pero no PTHrP(1-36), indujo la capacidad proliferativa de las ASCs indiferenciadas, mientras que PTHrP(1-36), pero no VEGF, indujo la proliferación de las ASCs previamente tratadas con medio de diferenciación osteogénica, confirmando el papel diferencial de estos factores de crecimiento en distintos estadios de diferenciación.

Materiales y métodos

Aislamiento, cultivo primario y estudio funcional de ASCs

El tejido adiposo subcutáneo abdominal se obtuvo durante la cirugía de pacientes sanos mediante la técnica de liposucción. Seis mujeres se incluyeron en este estudio con una edad promedio de 40 años (rango 25-60 años). Todos los donantes dieron su consentimiento informado, de acuerdo con el protocolo clínico apropiado. Los pacientes fueron operados en el Departamento de Cirugía Plástica de HM Hospitales (Madrid, España), y la recogida de muestra de tejido fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional/Comité Ético de Investigación Clínica de HM Hospitales (Madrid, España). El tejido adiposo fue digerido en 0,075% de solución colagenasa tipo I (Invitrogen, Life Technologies, Nueva York, EE.UU.) durante 30 minutos a 37°C, siguiendo el protocolo descrito anteriormente⁴. A continuación, las células se sembraron en superficie plástica (Corning, Nueva York, EE.UU.) durante 24 horas en Medio de Crecimiento DMAX (Invitrogen, Life Technologies, Nueva York, EE.UU.) con 10% de FBS (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EE.UU.) y suplementado con antibióticos: penicilina (100 IU/ml) y estreptomina (100 mg/ml) (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EE.UU.). Las células no adherentes se retiraron, y se añadió medio fresco para el cultivo primario de la fracción de células adherentes durante 7 días. El medio de cultivo se reemplazó cada 3 días. En ese momento, las ASC fueron funcionalmente fenotipadas por citometría de flujo y se analizó su potencial de diferenciación osteogénica.

Citometría de flujo

Para el análisis de citometría de flujo, las ASC se resuspendieron en PBS (tampón fosfato salino) a una densidad de 1x10⁶ células/ml, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% y se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón conjugados (FITC o PE) con anti- CD90, CD29, CD34, CD45, CD106 CD44, CD144, CD31 y KDR (BioLegend, San Diego, California, EE.UU.) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se analizaron mediante Accuri's C6 Flow System citómetro a 488 nm y 15 mW. La dispersión frontal (FSC), dispersión lateral (SSC) y el marcador fluorescente específico (LGFL) a 488 nm y 540 nm se obtuvieron de forma automática para cada célula. Los datos se recogieron digitalmente sobre un rango dinámico de 16 millones de canales de datos digitales. La amplificación y análisis logarítmico de fluorescencia se realizó utilizando BD Accuri™ Software de Análisis C6.

Ensayos de diferenciación osteogénica

Se utilizó el medio de diferenciación osteogénica de linaje celular para evaluar el potencial de diferenciación osteogénica de ASC. Para dicha diferenciación las ASC se cultivaron durante 14 días en presencia de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) con 10% FBS, 10⁻⁸ M de dexametasona, 0,5 mg/ml de ácido ascórbico y 0,1 M de β glicerol-fosfato (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EE.UU.). El medio se reemplazó cada 3 días, y al finalizar el periodo de 14 días se realizó la tinción histoquímica



rojo de alizarina para revelar y cuantificar el número de células por campo microscópico rodeadas por matriz extracelular mineralizada teñida con rojo de alizarina. Así mismo se realizó una comprobación de la diferenciación osteoblástica mediante ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), que consistió en la identificación de los depósitos teñidos de rojo que indican actividad fosfatasa alcalina mediante el kit 86R de Sigma Aldrich. ASCs de seis pacientes diferentes se utilizaron en cada ensayo.

Estudios de proliferación celular

Se estudió la respuesta relacionada con la proliferación de las ASCs a factores como el VEGF (160 pM) y la PTHrP(1-36) (100 nM) en los cultivos durante 24 horas, tanto en medio de crecimiento como en medio de diferenciación osteogénica. Para la medición de la proliferación de estos ensayos se utilizó el equipo de medición *xCelligent System* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) que, a tiempo real, midió la proliferación celular. El sistema *xCelligent* proporcionó medidas de proliferación a tiempo real y final a través de la lectura de unas placas de cultivo dotadas de electrodos que detectaron los cambios de morfología de las células, proporcionando un parámetro llamado *Cell Index* extrapolable a la proliferación celular.

Extracción de ARN total y PCR cuantitativa a tiempo real

Las ASCs, tanto en condiciones basales como las diferenciadas a osteoblastos, fueron sometidas a extracción de ARN total de un homogeneizado celular con un método estándar con tiocianato de guanidilo-fenol-cloroformo (Tri-Reagent®, MCR; Cincinnati, Ohio, EE.UU.). La pureza y cuantificación del ARN total extraído se determinó mediante espectrofotometría A_{260}/A_{280} (*Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometer*, Thermo Scientific). La síntesis de ADNc se realizó utilizando oligonucleótidos aleatorios y una transcriptasa inversa

(*High capacity RNA to cDNA Kit*, Applied Biosystem; Foster City, California, EE.UU.). El análisis de la expresión génica por RT-PCR a tiempo real se realizó con ADNc resultante utilizando una polimerasa activada por calor, TaqDNA (*Taqman gene expression master mix*, Applied Biosystem; Foster City, California, EE.UU.) y cebadores específicos humanos para RUNX2, (Hs00231692 m1) OPG (TNFRSF1 Hs 00171068), VEGF-A (Hs 00173626 m1) y VEGFR2 (Hs 00176676 m1) (Applied Biosystem; Foster City, California, EE.UU.). Tras una incubación inicial de 10 minutos a 25°C y otra de 2 horas a 37°C, las muestras se sometieron a ciclos a 4°C. Los resultados se expresaron como niveles de expresión de cada gen (una vez normalizados frente a los ARN de 18s como gen constitutivo) en cada condición experimental, respecto a su control correspondiente: $2^{-\Delta Ct}$, donde Ct representa el ciclo umbral de PCR en el cual el programa detecta por primera vez un incremento apreciable de fluorescencia sobre la señal basal. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. ($\Delta Ct = Ct$ (Gen de interés) – Ct (control endógeno 18S)).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media +/- Desviación Estándar (DE). La comparación no paramétrica entre las medias de dos muestras se realizó por la prueba de Mann Whitney. Se utilizó ANOVA no paramétrica para comparar varias muestras (Kruskal-Wallis). Todos los valores con $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Resultados

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización de las ASCs procedentes del cultivo primario de los lipoaspirados. El análisis fenotípico de ASC por citometría de flujo reveló que 99,6% eran CD90⁺, 91,6% CD44⁺, 90,4% CD 29⁺, 4,2% CD34⁺, 2,2% CD45⁺. Además, se analizaron los marcadores CD106, CD 155, KDR y CD 31, todos ellos de expresión negativa para ASCs (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización por citometría de flujo de las ASCs aisladas de tejido adiposo obtenido por lipoaspirado

Marcador superficie	Expresión esperada	% medio de expresión obtenido
CD 90	(+) para célula mesenquimal	94,6%
CD 44	(+) para célula mesenquimal	91,6%
CD 29	(+) para célula mesenquimal	90,4%
CD 45	(-) para célula mesenquimal	2,2%
CD 34	(-) para célula mesenquimal	4,2%
CD 106	(+) para célula endotelial	7,6%
	(-) para célula mesenquimal	
CD 144	(+) para célula endotelial	0,6%
KDR	(+) para célula endotelial	0,5%
CD 31	(+) para célula endotelial	0,2%



Para evaluar el potencial de diferenciación osteogénica de ASC, se las sometió a diferenciación osteoblástica *in vitro*. Como se muestra en la Figura 1A, la actividad ALP reveló que las ASCs en medio de diferenciación osteogénica habían sufrido dicha diferenciación. La tinción citoquímica rojo de alizarina (Figura 1B) también reveló el resultado positivo de la diferenciación osteogénica.

Se evaluó la expresión génica de algunos de los marcadores de diferenciación osteogénica como OPG y Runx2^{12,13,24}. Se observó que la expresión de estos dos marcadores analizados aumentó significativamente ($p < 0,05$) tras 14 días de cultivo con el medio de diferenciación osteogénica (Figura 2A-B).

Se evaluó la expresión génica del sistema VEGFA y su receptor inducido por la diferenciación osteogénica. Tal y como se puede observar en la figura 3, tras 7 días de diferenciación las células disminuyen significativamente la expresión del VEGF y de su receptor tipo 2.

Los ensayos de proliferación celular con medios suplementados con PTHrP y VEGF mos-

traron resultados diferentes. Se realizó un estudio de proliferación de las ASCs en respuesta a VEGF (160 pM) durante 24 horas en condiciones basales (medio de crecimiento) o con medio de diferenciación osteogénica.

Como se observa en la figura 4, el VEGF, aumentó de manera significativa la proliferación de las ASCs en medio de crecimiento, pero no tuvo efectos significativos sobre la proliferación de las células cultivadas en medio de diferenciación osteogénica ($p < 0,05$). Los resultados indicaron que VEGF, aumentó la proliferación de las ASCs, pero siempre que éstas no hubieran iniciado su proceso de diferenciación. En respuesta a PTHrP(1-36) (100 nM) durante 24 horas, las ASCs no alteraron significativamente su índice de proliferación (Figura 4A). Cuando se realizó el ensayo de proliferación anteriormente descrito en medio de diferenciación osteogénica, se observó que éste cambiaba el fenotipo de las ASC, y alteraba su capacidad de respuesta ante estos factores. De forma que en este caso PTHrP incrementó el índice de proliferación en células ya comprometidas a la diferenciación osteoblástica (Figura 4B).

Figura 1. Respuesta del cultivo primario de ASC a los medios específicos de diferenciación de linaje celular. (A) Detección de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) y (B) detección de la diferenciación osteogénica de 14 días mediante la tinción con rojo de alizarina para detectar mineralización

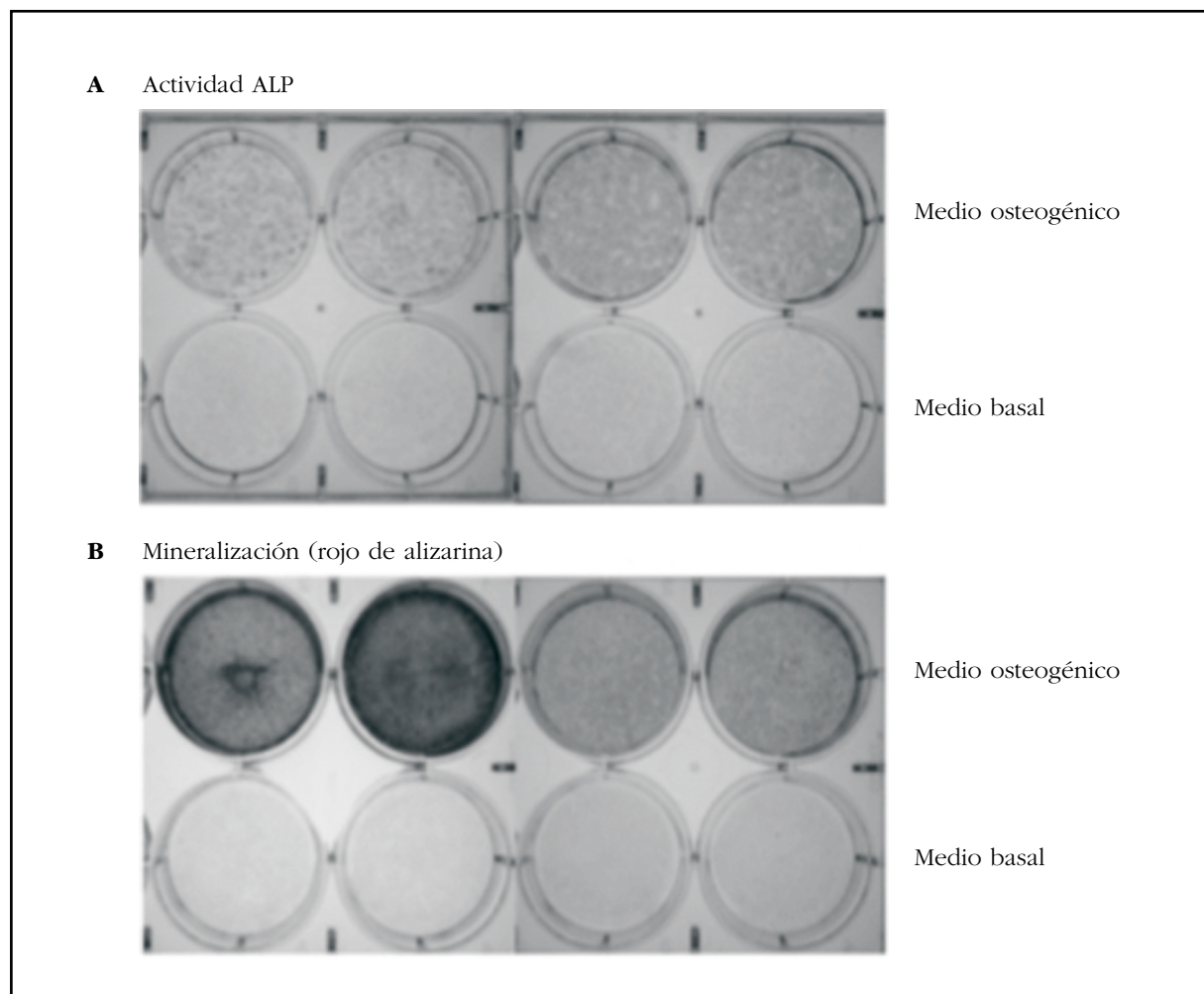
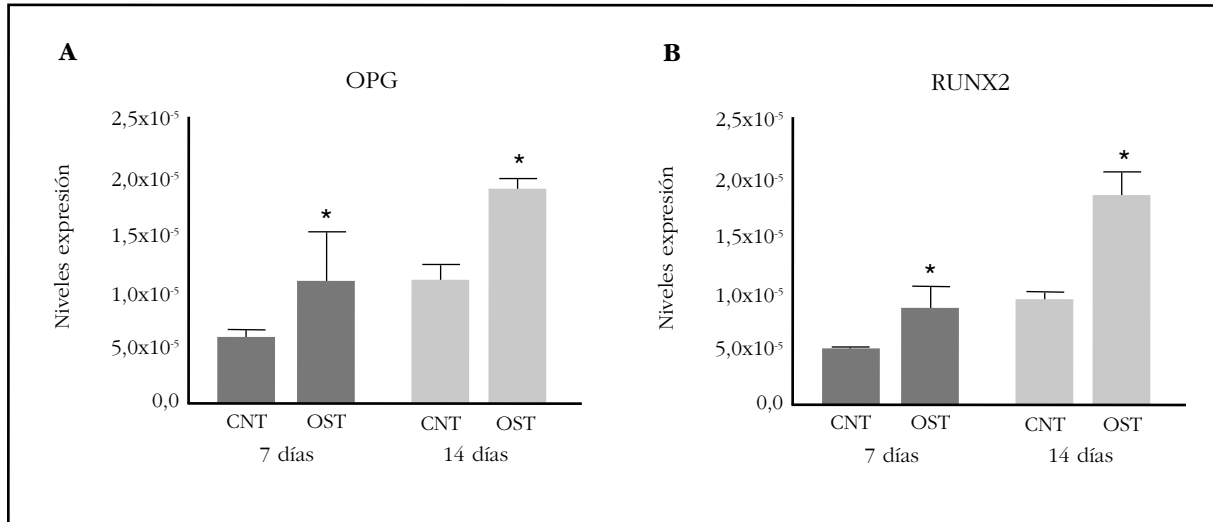


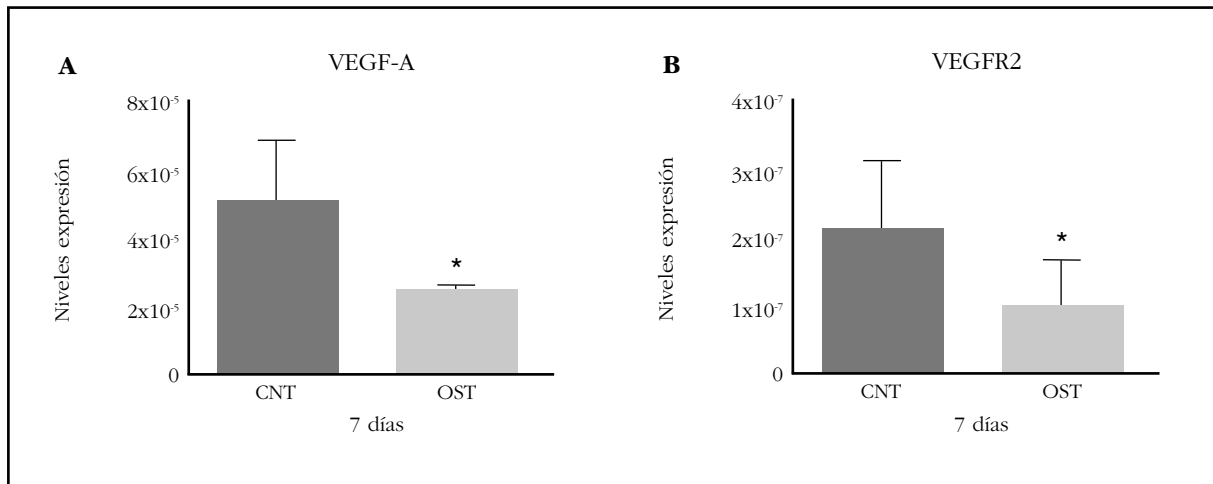


Figura 2. Cambios en la expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de factores de diferenciación ósea: (A) OPG, (B) Runx2, a distintos tiempos de diferenciación osteoblástica



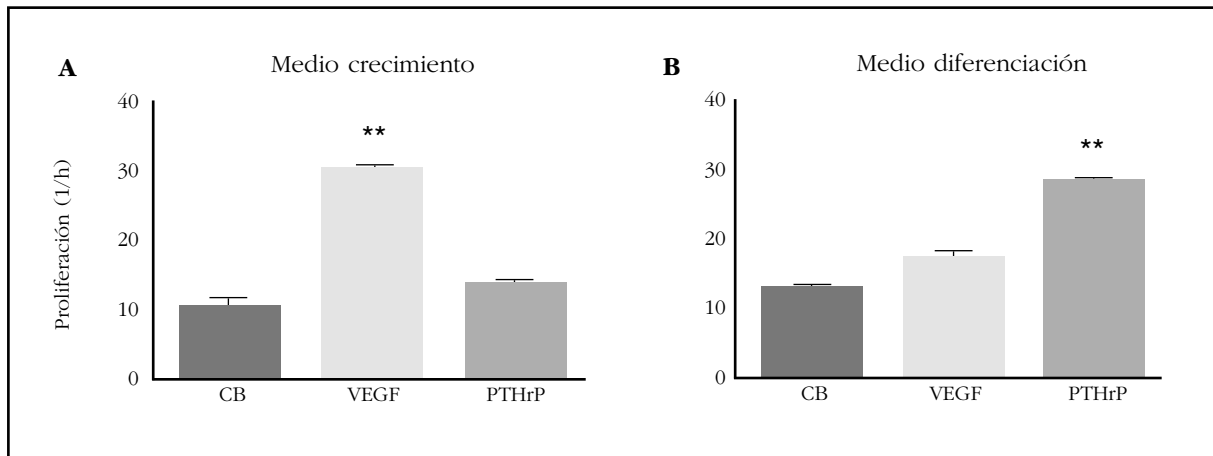
(*) $p < 0,05$ vs. valor basal correspondiente.

Figura 3. Cambios en la expresión génica tras 7 días de diferenciación (analizada por PCR a tiempo real) de factores de angiogénesis: (A) VEGF-A y (B) VEGFR2



(*) $p < 0,05$ vs. valor basal correspondiente.

Figura 4. Índice de proliferación celular (10^3) en cultivos de ASCs sometidos a estímulos con 160 pM de VEGF₁₆₅ y 100 nM de PTHrP durante 24 horas. (A) Proliferación en medio de crecimiento. (B) Proliferación en medio de diferenciación osteogénica



(**) $p < 0,05$ vs. valor basal correspondiente.



Discusión

En el presente estudio, ASCs de mujeres sanas, se expusieron a tratamientos cortos con PTHrP y VEGF en distintas condiciones de diferenciación y su capacidad proliferativa fue analizada. Nuestros resultados indican que las poblaciones más indiferenciadas serían más sensibles a VEGF mientras que los progenitores ya comprometidos hacia la diferenciación osteoblástica responden mejor a PTHrP(1-36), al mostrar una mayor expresión del receptor 1 de la PTH/PTHrP (PTH1R). Se utilizaron ASCs humanas procedentes de lipoaspirados como modelo *in vitro* de diferenciación osteogénica. Durante este estudio la caracterización de las ASCs se llevó a cabo mediante un estudio de los marcadores de superficie celular. Los datos obtenidos fueron los esperados según estudios previos^{21,22}. Así mismo se estudió la capacidad de diferenciación osteoblástica de las ASCs. Dicha diferenciación se verificó por la actividad ALP de estas células tras 14 días en medio de diferenciación osteogénica. Del mismo modo, la tinción histoquímica de rojo de alizarina se utilizó para verificar dicha diferenciación complementando así el análisis de actividad ALP. Además, se evaluó la expresión génica de algunos marcadores como OPG y Runx2^{16,23}. Runx2 es esencial para la diferenciación osteoblástica, conduce a las ASCs hacia el linaje osteoblástico e inhibe su diferenciación hacia linaje adipogénico o condrogénico²³. Además, Runx2 se ha descrito como un factor que mantiene a los osteoblastos en estado inmaduro sin diferenciarse a osteocitos²³. Así mismo, estudios previos consideran a OPG como un marcador de diferenciación osteogénica temprana en células mesenquimales humanas²⁴. Según lo esperado, nuestros datos muestran que la diferenciación osteogénica induce un aumento en la expresión de estos dos marcadores, OPG y Runx2, respecto al estado indiferenciado.

También se evaluó la expresión génica del sistema VEGFA y su receptor VEGFR2 en condiciones de diferenciación osteogénica. Tras siete días en presencia del medio de diferenciación osteogénica se observó una disminución en la expresión del VEGF y de su receptor tipo 2. En este estudio hipotetizamos que los efectos de VEGF y PTHrP sobre la proliferación celular de los osteoprogenitores son dependientes del estadio de diferenciación osteoblástica. Así, las poblaciones más indiferenciadas serían más sensibles a VEGF por su proximidad al nicho endotelial *in vivo*, mientras que los progenitores ya comprometidos hacia la diferenciación osteoblástica responderían mejor a PTHrP(1-36) al mostrar el receptor PTH1R un rol más importante en osteoblastos maduros y osteocitos. Tras confirmar su capacidad de diferenciación *in vitro* por expresión génica de Runx2 y mineralización, se analizó la respuesta proliferativa a estímulos con VEGF o PTHrP(1-36) de ASCs sometidas o no a inducción osteogénica. VEGF, pero no PTHrP(1-36), favoreció la capacidad proliferativa de las ASCs no inducidas, mientras que PTHrP(1-36), pero no VEGF, favoreció la prolifera-

ción de las ASCs previamente diferenciadas, confirmando el papel diferencial de estos factores de crecimiento en distintos estadios de diferenciación. Estudios previos indican que el VEGF secretado es crítico en la diferenciación de las BMSCs a osteoblastos, frenando su diferenciación a otros linajes celulares como el adipogénico^{16,17}. Así mismo, Alonso y cols.¹⁵ han mostrado como VEGF y PTHrP modulan la diferenciación y supervivencia de los osteoblastos. Nuestros resultados del estudio de proliferación de las ASCs en respuesta a VEGF durante 24 horas en medio de crecimiento o con medio de diferenciación osteogénica muestran un aumento en la proliferación de las ASCs crecidas en medio normal, pero sin efectos significativos sobre la proliferación de las células cultivadas en medio de diferenciación osteogénica, apoyando la noción de que VEGF ejerce un papel preponderante sobre la regulación de la proliferación en etapas tempranas de la diferenciación, aunque estudios previos apuntan también a una implicación de VEGF en la supervivencia de los osteoblastos¹⁵.

Tras 24 horas de tratamiento con PTHrP(1-36), las ASCs indiferenciadas no vieron alterado su índice de proliferación. Sin embargo, en presencia de medio de diferenciación osteogénica, PTHrP(1-36) aumentó significativamente la proliferación, apuntando a la implicación de este factor en la proliferación de BMSCs comprometidas a la diferenciación osteogénica *in vivo*.

De esta forma podríamos concluir que, si bien estudios previos han mostrado que VEGF y PTHrP modulan la diferenciación y supervivencia de los osteoblastos¹⁵, estos factores podrían regular la proliferación de los osteoprogenitores en función de su compromiso o no hacia la diferenciación osteoblástica, estando VEGF más implicado en la proliferación de progenitores más indiferenciados y próximos al nicho perivascular, mientras que la PTHrP(1-36) estimularía células más comprometidas hacia la osteoblastogénesis.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses en relación con este trabajo.

Bibliografía

1. Friedenstein AY, Lalykina KS. Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcif Tissue Res.* 1970;Suppl:105-6.
2. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):313-9.
3. Swords BJ, Yoshizawa S, Mishra PJ, Cherman N, Kuznetsov SA, Merlino G, et al. Molecular profile of clonal strains of human skeletal stem/progenitor cells with different potencies. *Stem Cell Res.* 2015;14:297-306.
4. Van Harmelen V, Röhrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism.* 2004;53:632-7.
5. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaut L, Casteilla L. From heterogeneity to plasti-



- city in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res.* 2006;312:727-36.
6. Su X, Lyu Y, Wang W, Zhang Y, Li D, Wei S, et al. Fascia Origin of Adipose Cells. *Stem Cells.* 2016; 34:1407-19.
 7. Nakagomi T, Kubo S, Nakano-Doi A, Sakuma R, Lu S, Narita A, et al. Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. *Stem Cells.* 2015;33:1962-74.
 8. Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cells. *Development.* 2015;142:1023-7.
 9. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100: 1249-60.
 10. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142:5050-5.
 11. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 2004;22:560-7.
 12. Esbrit P, Herrera S, Portal-Núñez S, Nogués X, Díez-Pérez A. Parathyroid Hormone-Related Protein Analogs as Osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2016;98: 359-69.
 13. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669-76.
 14. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2000;141: 1667-74.
 15. Alonso V, Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol.* 2008;217:717-27.
 16. Liu Y, Olsen BR. Distinct VEGF functions during bone development and homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62:363-8.
 17. Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lotinun S, Baron R, Ferrara N, et al. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 2012;122:3101-13.
 18. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999;104:439-46.
 19. Jilka RL, O'Brien CA, Ali AA, Roberson PK, Weinstein RS, Manolagas SC. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts. *Bone.* 2009;44:275-86.
 20. Suda N, Gillespie MT, Traianedes K, Zhou H, Ho PW, Hards DK, et al. Expression of parathyroid hormone-related protein in cells of osteoblast lineage. *J Cell Physiol.* 1996;166:94-104.
 21. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2003;5:362-9.
 22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells; The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-7.
 23. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1233-9.
 24. Song SJ, Jeon O, Yang HS, Han DK, Kim BS. Effects of culture conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17:1113-9.