



ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

“Modulación epigenética de *RUNX2* en células troncales mesenquimáticas humanas de la gelatina de Wharton mediante inhibición farmacológica”.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Lorena Andrea Díaz Hemard

Directora del Seminario de Título:

Verónica Palma Alvarado, PhD

Laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo, Universidad de Chile

Co-Director del Seminario de Título:

Martín Montecino Leonard, PhD

Laboratorio de Regulación Génica, Universidad Andrés Bello

Julio 2017, Santiago de Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Lorena Andrea Díaz Hemard,

Modulación epigenética de *RUNX2* en células troncales mesenquimáticas humanas de la gelatina de Wharton mediante inhibición farmacológica.

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Verónica Palma A.

Directora Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. María Rosa Bono

Presidente Comisión

Dra. Lorena Norambuena

Evaluador

Santiago de Chile, Julio 2017

BIOGRAFÍA



Nací el 21 de diciembre del año 1992, inaugurando la temporada estival. Crecí en la comuna de Peñalolén, cuando aún era seguro andar en bicicleta por la calle con los vecinos, hasta que a los 8 años nos mudamos con mis padres a Providencia. Ahí finalicé mis estudios en el Colegio Pedro de Valdivia, luego de lo cual me decidí a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile.

Durante la enseñanza media ya había tomado cursos de la Escuela de Verano de la Universidad de Chile, de Genética en la Facultad de Medicina y de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Pero no fue hasta una visita a la Facultad de Ciencias, organizada por mi colegio para alumnos de cuarto medio, en donde cargué una muestra en un gel de agarosa, que me decidí por mi carrera. Sin tener la intención, desde muy pequeña mi padre me transmitió ese espíritu curioso y la inquietud por conocer más acerca de los organismos vivos y su relación con el entorno. Por eso, nunca estuvo en duda estudiar algo relacionado con ciencias y, especialmente, en el área de la biología.

La entrada a la universidad significó un sinnúmero de experiencias nuevas, conocer personas con realidades e historias de vida muy diferentes a lo que estaba acostumbrada. Al mismo tiempo, los estudios pasaron a ser una responsabilidad exclusivamente mía, y estaba siempre la presión por rendir académicamente e intentar compatibilizar todo aquello con la vida fuera de la universidad.

Con el ánimo de aprender y explorar ciertas áreas de la biotecnología que más llamaban mi atención, hice una Unidad de Investigación el año 2013 en el Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura en la Facultad de Ciencias Agronómicas, con la Dra. María Angélica Larraín Barth, en el contexto del Proyecto FONDECYT Regular N°1130302. El siguiente año estuve cerca de un semestre en el Laboratorio de Terapia Celular de Cells for Cells en la Universidad de Los Andes, aprendiendo sobre el manejo de células troncales humanas con la Dra. María Alejandra López Verilli. El año 2015 ingresé al Laboratorio de Biología del Desarrollo y Células Troncales de la Dra. Verónica Palma a hacer una Unidad de Investigación, bajo la tutela del Dr. Francisco Bustos,

donde trabajé con células troncales mesenquimáticas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical. Tuve la oportunidad de trabajar también en el Laboratorio de Regulación Génica del Dr. Martin Montecino en la Universidad Andrés Bello, particularmente con el Dr. Hugo Sepúlveda, en el contexto de la colaboración entre ambos laboratorios del Centro FONDAP de Regulación del Genoma (CGR). Todo este trabajo está plasmado en el seminario de título que estoy presentando hoy.

En el camino, descubrí mi pasión por la comunicación de las ciencias y la educación científica, y tengo la convicción de que ese es el destino que quiero perseguir. He tenido la oportunidad de publicar columnas de opinión en algunos portales de divulgación científica, que es algo que pretendo continuar. Mi intención es contribuir a la discusión que, afortunadamente, se está instalando a nivel nacional sobre la importancia de la investigación científica y la relevancia de la formación científica en las generaciones jóvenes.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres por su apoyo incondicional, no sólo en este proceso, sino en todos los aspectos de la vida. Gracias por darme la oportunidad de estudiar lo que me apasiona, si no fuese por su esfuerzo y por los valores que me entregaron, yo no estaría recibiendo mi título universitario. Aún más importante, gracias por enseñarme sobre disciplina, constancia y perseverancia, con el amor que los caracteriza, que son las herramientas que necesito para cumplir mis metas. Gracias por aguantar el mal genio y la falta de tiempo, y que desapareciera los fines de semana por estar en el laboratorio.

Le agradezco enormemente a la Dra. Verónica Palma por recibirme en su laboratorio para realizar mi seminario de título y por permitirme aprender acerca del área de las células troncales. Muchas gracias a quienes hicieron esto posible desde el rol de tutores, Francisco y Hugo, también a Catalina que asumió en algún momento esa posición: gracias por el tiempo y la disposición de ayudar, y por la preocupación de que realmente entendiera lo que estaba haciendo para poder aplicarlo a futuro. Por supuesto a quienes componen el laboratorio, gracias por la buena onda y el buen sentido del humor, que es sumamente necesario en períodos estresantes, que bien sabemos que abundan en esta

profesión. Hago mención especial a la Pauli, Dani, Marce, Ignacio, Chini y Cata, con quienes formé un vínculo más allá del compañerismo netamente laboral, muchas gracias por haberme acompañado y que eso se mantenga de aquí en adelante.

Quiero agradecer también al Dr. Martin Montecino por permitirme realizar parte del trabajo en su laboratorio y por ser el co-director del seminario de título, al Dr. Hugo Sepúlveda por dedicar su tiempo y su energía en ser mi tutor en el LRG, y a los chicos del laboratorio en general por recibirme con buena onda y con disposición de ayudar en lo que necesitara.

A mis amigos del colegio: Dani, Caro, Naty, Vale y Pablo, y a mi amiga de la vida, Caro, gracias por escuchar mis descargos, por sus palabras de aliento y por la inyección de energía que significaba juntarnos, aunque fuera difícil concretar esas juntas. Gracias por el cariño infinito y el empuje que me entregaron a lo largo de todo el proceso, en los buenos y malos momentos, y perdón por las incontables ausencias por estar trabajando. ¡Los quiero muchísimo!

Por último, agradecer al proyecto FONDEF D09E1047 de la Dra. Verónica Palma por el financiamiento de la investigación

ÍNDICE

Biografía	iii
Agradecimientos	v
Índice de contenidos	v
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	viii
Abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción.....	1
1.1. Patologías y trastornos óseos.....	1
1.2. Ingeniería de tejidos óseos	3
1.3. Osificación y células troncales mesenquimáticas (MSC)	5
1.3.1. Expresión génica asociada al compromiso a linaje óseo en MSC.....	7
1.3.2. Aplicación de MSC en reparación ósea.....	11
1.3.3. Modulación de la diferenciación osteoblástica en MSC.....	14
1.3.4. Regulación epigenética de <i>RUNX2</i> en MSC.....	17
1.3.4.1. Estructura del gen <i>RUNX2</i>	17
1.3.4.2. Modificación de la cromatina en el control de la expresión génica.....	18
1.3.4.3. Mecanismos epigenéticos en el compromiso a linaje osteoblástico.....	20
1.4. Ventajas del uso de MSC en biomedicina	21

1.4.1. Células troncales multipotentes del cordón umbilical.....	23
1.4.1.1. MSC derivadas de la gelatina de Wharton.....	25
1.4.1.2. Cambios en el perfil epigenético de <i>RUNX2</i> en WJ-MSC durante la diferenciación osteoblástica.....	28
1.6. Hipótesis.....	29
1.7. Objetivo general.....	29
1.8. Objetivos específicos.....	30
2. Materiales y métodos.....	31
2.1. Cultivo celular.....	31
2.2. Diferenciación osteoblástica.....	32
2.3. Tratamiento farmacológico.....	32
2.3.1. Determinación de la dosis óptima de PBIT en WJ-MSC.....	32
2.3.2. Protocolo de inhibición farmacológica a corto y largo plazo.....	34
2.4. Ensayos de silenciamiento de JARID1B.....	35
2.5. Análisis porPCR cuantitativo.....	36
2.6. Extracción de proteínas nucleares y análisis por Western Blot.....	38
2.6.1. Colección de muestras y aislamiento de proteínas nucleares.....	38
2.6.2. Western Blot.....	39
2.6.3. Revelado por quimioluminiscencia.....	40
2.7. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	40
2.8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	41

2.9. Mineralización.....	43
2.9.1. Tinción con Alizarin Red S.....	43
2.9.2. Ensayo de actividad fosfatasa alcalina.....	44
2.9.3. Cuantificación de calcio.....	45
2.10. Análisis estadístico.....	45
3. Resultados	46
4. Discusión.....	62
5. Conclusiones.....	70
6. Bibliografía	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Partículas lentivirales <i>short hairpin</i> RNA utilizadas en los ensayos de silenciamiento de JARID1B en WJ-MSC	36
Tabla 2	Partidores utilizados en PCR cuantitativo	37
Tabla 3	Condiciones de reacción en el análisis por PCR cuantitativo.....	38
Tabla 4	Anticuerpos utilizados en la detección de proteínas por Western Blot	40
Tabla 5	Composición de buffers para CHIP.....	42
Tabla 6	Partidores utilizados en ensayos de CHIP.....	42
Tabla 7	Anticuerpos utilizados en ensayos de CHIP.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Los tres pilares de la ingeniería de tejidos: matriz, células y factores de crecimiento (moléculas bioactivas)	4
Figura 2	Vías de osificación endocondral e intramembranosa en MSC	6

Figura 3	La diferenciación de MSC a osteoblastos y osteocitos es regulada por factores de transcripción, hormonas y moduladores fisiológicos asociados a múltiples vías de señalización	8
Figura 4	Regulación de la expresión génica dependiente de <i>RUNX2</i> , durante la diferenciación osteoblástica de MSC	10
Figura 5	Sobreexpresión lentiviral de <i>Runx2</i> exógeno en WJ-MSC	16
Figura 6	Estructura del gen <i>Runx2</i>	18
Figura 7	Ilustración de un corte transversal de cordón umbilical humano que muestra sus elementos y regiones característicos	24
Figura 8	La potencia celular de las células troncales fetales (líquido amniótico, gelatina de Wharton, placenta y membrana amniótica) es un intermedio entre pluripotencia y multipotencia	25
Figura 9	Determinación de la dosis óptima del inhibidor PBIT en WJ-MSC en ensayos a corto plazo	33
Figura 10	Protocolo experimental de inhibición farmacológica a largo plazo en WJ-MSC	35
Figura 11	Expresión de ARNm relativa a <i>GAPDH</i> de los genes <i>RUNX2-P57</i> y <i>JARID1B</i> en WJ-MSC en función del tiempo de cultivo	47
Figura 12	Western Blot de <i>RUNX2</i> y <i>JARID1B</i> en extractos nucleares de WJ-MSC en días 0, 4, 8, 15 y 21	48
Figura 13	Mineralización en WJ-MSC inducidas a diferenciación osteoblástica: actividad fosfatasa alcalina y deposición de sales de calcio.....	49
Figura 14	Cambios epigenéticos en el promotor P1 de <i>RUNX2</i> asociados a diferenciación osteoblástica en WJ-MSC	50
Figura 15	Determinación de la dosis y concentración óptimas de PBIT en WJ-MSC en ensayos de diferenciación osteoblástica a corto plazo (48 hrs)	52
Figura 16	Los genes housekeeping <i>hGAPDH</i> y <i>rRPL29</i> no se comportan como tal en etapas avanzadas de la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC en tratamiento con PBIT 1 μ M.....	53
Figura 17	Cambios en la concentración de H3K4me3 durante el tratamiento farmacológico de WJ-MSC con PBIT 1 μ M.....	54
Figura 18	Mineralización terminal en WJ-MSC bajo tratamiento farmacológico, evaluada mediante tinción con Alizarin Red S.....	55
Figura 19	Mineralización en WJ-MSC en tratamiento con PBIT.....	57
Figura 20	Silenciamiento de <i>JARID1B</i> en WJ-MSC	59

Figura 21	Clasificación de MSC humanas	67
Figura 22	Modelo gráfico.....	70

ABREVIATURAS

AD-MSC	Células troncales mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BM-MSC	Células troncales mesenquimáticas derivadas de médula ósea
BMP	Proteína morfogenética de hueso
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ESC	Células troncales embrionarias
FBS	Suero Fetal Bovino
GAPDH	Gliceraldehído 3 - fosfato deshidrogenasa
HAT	Acetil-transferasa de histonas
HDAC	Deacetilasa de histonas
hMSC	Células troncales mesenquimáticas humanas
HMT	Metil-transferasa de histonas
HSC	Células troncales de tejido hematopoyético

iPSC	Células pluripotentes inducidas
MSC	Células troncales mesenquimáticas
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
P/S	Solución Penicilina-Estreptomicina
PTM	Modificación post-traducciona
qPCR	PCR cuantitativo
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
SDS	Dodecilsulfato Sódico
T _m	Temperatura de denaturación térmica
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
WJ-MSC	Células troncales mesenquimáticas de la gelatina de Wharton

RESUMEN

Anualmente se producen cerca de 9 millones de fracturas por fragilidad ósea en el mundo. El hueso es el segundo tejido con mayor demanda de trasplantes en el sistema de salud, en donde se emplean injertos autógenos y alógenos. Ante este escenario, el desarrollo de injertos óseos biocompatibles utilizando células troncales adultas para la optimización de la regeneración ósea es una solución con enorme potencial biomédico. En este trabajo se propuso aumentar el potencial osteoblástico de células madre mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton (WJ-MSC), a través de la pérdida de función de JARID1B, represor epigenético del gen maestro *RUNX2*. En investigaciones antecedentes al seminario de título, se demostró que el silenciamiento de JARID1B en células C2C12 es capaz de incrementar la expresión de *RUNX2-P57*. Además, se logró establecer que el estado epigenético de los promotores de *RUNX2* y *SP7*, en cuya regulación participa JARID1B como demetilasa de histonas, posee un rol fundamental en la mantención del limitado potencial osteoblástico de WJ-MSC.

En este seminario de título se establecieron las condiciones experimentales para el tratamiento de WJ-MSC con el fármaco PBIT, un inhibidor de la actividad de JARID1B, durante la diferenciación osteoblástica. El tratamiento con PBIT resultó en un aumento significativo de la expresión de *RUNX2-P57*, en conjunto con el enriquecimiento de la marca epigenética H3K4me3 en el promotor P1 de *RUNX2*. Sin embargo, no se observaron diferencias con respecto a la mineralización por deposición de sales de calcio en etapas tardías de la diferenciación en respuesta al tratamiento farmacológico. El silenciamiento de JARID1B resultó en un aumento de la expresión de *RUNX2-P57*, además del enriquecimiento de las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K27Ac en su promotor.

En concordancia con estudios previos realizados en el laboratorio, se concluye que las WJ-MSC poseen un potencial osteoblástico restringido, evidenciado por la activación de genes osteoblásticos tempranos y no de marcadores tardíos, frente a la inducción a diferenciación osteoblástica. Se reafirma así la propuesta de una barrera epigenética en *RUNX2*, que restringe el compromiso a linaje osteoblástico en WJ-MSC, dada por el origen ontogénico temprano de estas MSC, directamente relacionado con su potencial de desarrollo. La modulación epigenética en WJ-MSC, por medio de JARID1B, es capaz de incrementar significativamente la expresión de genes osteoblásticos tempranos, no así de potenciar la formación de osteoblastos y el proceso de mineralización.

Proponemos el co-cultivo de WJ-MSC tratadas con PBIT sobre matrices biocompatibles, además de la adición de otros inductores de diferenciación osteoblástica, como BMP2, al medio de cultivo. Asimismo, se sugiere ensayar la adición de las moléculas de la vía de señalización Wnt, *WISP1* y *sFRP4*, con el objetivo de incrementar el potencial osteoblástico de cultivos primarios de WJ-MSC.

En definitiva, a pesar del enorme potencial terapéutico de las WJ-MSC, es necesario un mayor entendimiento de los mecanismos celulares que limitan el compromiso a linaje óseo, particularmente en relación a la barrera a nivel epigenético propuesta a raíz de nuestro trabajo con WJ-MSC, para respaldar sólidamente su uso en ingeniería de tejidos óseos y terapia regenerativa.

ABSTRACT

Worldwide, over 9 million bone fragility fractures are estimated to occur per year. Bone is the second most demanded tissue for transplantation in the health system, where autologous and allogenic grafts are used. In this scenario, the development of biocompatible bone grafts using adult stem cells for the optimization of bone regeneration is a solution with enormous potential in biomedicine.

In this work, we aimed to increase the osteoblastic potential of mesenchymal stem cells derived from the Wharton's Jelly of the umbilical cord (WJ-MSC), through the loss of function of JARID1B, an epigenetic repressor of the master gene *RUNX2*. In previous work, it was demonstrated that knockdown of JARID1B in the cell line C2C12 is capable of increasing *RUNX2-P57* expression. Also, it was established that the epigenetic state of the promoters of *RUNX2* and *SP7* has a fundamental role in the maintenance of the limited osteoblastic potential of WJ-MSC.

In the present thesis, we set the experimental conditions for the treatment of WJ-MSC in osteoblastic differentiation with the drug PBIT, an inhibitor of the activity of JARID1B. PBIT treatment resulted in a significant increase in *RUNX2-P57* expression, along with the enrichment of the epigenetic mark H3K4me3 at *RUNX2* P1 promoter. However, there were no differences in mineralization due to calcium salts deposition in late stages of osteoblastic differentiation, in response to pharmacological treatment. Knockdown of JARID1B resulted in an increase in *RUNX2-P57* expression and in the enrichment of the epigenetic marks H3K4me3 and H3K27Ac at *RUNX2* promoter.

In concordance with previous research from our laboratory, we conclude that WJ-MSC have a restricted osteoblastic potential, as evidenced by the activation of early osteoblastic genes, but not late osteoblastic markers, when induced to osteoblastic differentiation. The proposal of an epigenetic barrier in *RUNX2* that restricts the

commitment to the osteoblastic lineage in WJ-MSc is then reaffirmed. It is given by the early ontogenetic origin of this MSC and directly related with its developmental potential. Epigenetic modulation in WJ-MSc through JARID1B is capable of significantly increasing the expression of early osteoblastic genes, but it is not capable of enhancing osteoblasts formation and mineralization.

We propose the culture of PBIT-treated WJ-MSc over biocompatible matrix and the addition of other osteoblastic differentiation inducers such as BMP2. Similarly, we suggest testing the addition of molecules from the Wnt signaling pathway, like *WISP* and *sFRP4*, to increase the osteoblastic potential in primary cultures of WJ-MSc.

In summary, and despite their extensive therapeutic potential, a deeper understanding of the cellular mechanisms underlying the limitation to the commitment of WJ-MSc to the bone lineage is needed to strongly support its application in bone tissue engineering and regenerative therapy, particularly in respect to the epigenetic barrier proposed in the light of our work with WJ-MSc primary cultures.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Patologías y trastornos óseos

Los trastornos del aparato locomotor humano como las enfermedades osteoarticulares y del tejido musculoesquelético, están asociados a pérdida de masa y densidad ósea, lo que frecuentemente conduce a fracturas. Deficiencias congénitas severas del metabolismo óseo, enfermedades de autoinmunidad que no responden a tratamientos clínicos convencionales y alteraciones de la capacidad regenerativa local de cartílago o hueso, son algunas de las condiciones subyacentes a este grupo de patologías ortopédicas. Estas se presentan tanto en pacientes pediátricos como adultos, siendo más alta la incidencia de fracturas óseas en personas mayores de 50 años (Norambuena y col., 2012). En Chile la ocurrencia de fracturas de cadera es de 23.5 por 100 mil habitantes, estadística que aumenta en la población mayor a 70 años a más de 600 por 100 mil habitantes. En este grupo etario la tasa de mortalidad un año después de la lesión es de un 25%, datos nacionales que no distan demasiado de la realidad global (Wagner P y col., 2012). Según datos de la *International Osteoporosis Foundation*, se producen 25 mil fracturas por fragilidad al día, esto es, cerca de 9 millones al año (Akesson K y col., 2013). La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor de un 7% de quienes han sido afectados por fracturas de tejido óseo fallecen como consecuencia directa del traumatismo dentro del plazo de un año posterior a la lesión (OMS, 2015).

Se proyecta un aumento sostenido en la frecuencia de fracturas óseas a nivel mundial, tal que para el año 2050 se espera un total cercano a 6 millones. Como referencia, esta cifra es equivalente a más de tres veces la cantidad de nuevos casos de infección por VIH en adultos (15+) que se registran en un año (UNAIDS, 2016). Uno de los factores promotores más evidentes de este lamentable escenario es la transición demográfica

hacia una sociedad con elevada proporción de adultos mayores. Para el año 2050 se estima que la población mayor a 60 años alcance los 2 billones de personas (22% del total), cuando en 2015 se cifró en 900 millones (12% del total) (Ahmad W y col., 2015). El año 2012 en Chile, los adultos mayores (60+) representaban el 13% de la población, y se proyecta que en 2044 esta cifra llegue al 20,8% (Meza S, 2003).

El hueso es un tejido único que tiene la capacidad de regenerar completamente, sin dejar cicatriz, y de restaurar sus propiedades mecánicas de manera autónoma. En la remodelación del tejido óseo participan factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, que forman parte de una cascada de eventos fisiológicos coordinados e interconectados (Marzona L & Pavolini B, 2009). Sin embargo, una rehabilitación efectiva puede verse impedida cuando las facultades regenerativas intrínsecas del cuerpo son insuficientes. El tratamiento clínico de fracturas óseas comprende medicamentos analgésicos, hospitalización prolongada y cirugías de reconstrucción o sustitución ortopédica. La intervención quirúrgica más común es la implantación de injertos autógenos (el paciente es su propio donante) o alogénicos (bancos de tejido óseo cadavérico). El hueso es el segundo tejido con mayor demanda por transplantes en el mundo, después de la sangre (Oryan A y col., 2014). Se estima que anualmente se realizan más de 2 millones de implantes óseos (Mishra R y col., 2016).

Los aloinjertos son especialmente competentes en la reparación de grandes porciones de tejido perdidas por fractura o producto del deterioro tisular asociado a desórdenes metabólicos congénitos como diabetes mellitus (Lu H y col., 2003). Los aloinjertos pueden transmitir infecciones como hepatitis y VIH, y poseen un riesgo inherente de rechazo inmune. Los implantes autógenos están restringidos por la escasa disponibilidad de tejido óseo sano en el cuerpo del paciente y la eventual aparición de múltiples núcleos de contaminación. Aunque el riesgo de incompatibilidad inmune es insignificante, esta

aproximación involucra una intervención adicional que reviste sus propios peligros (Dickson G y col., 2007; Oryan A y col., 2014; Almubarak S y col., 2016). Por lo tanto, es claro que existe una necesidad urgente de desarrollar técnicas alternativas para el tratamiento de patologías y trastornos de hueso.

1.2. Ingeniería de tejidos óseos

En respuesta a la creciente incidencia de fracturas óseas y al elevado costo económico en que incurren los servicios de salud pública a nivel global, se han constituido esfuerzos multidisciplinarios que apuntan a formular una solución para la población afectada de manera costo-efectiva y que cumpla con los estándares establecidos de bioseguridad. La ingeniería de tejidos es una disciplina que integra la teoría y el conocimiento técnico de profesionales de distintas ramas científicas. Es considerada un área aún en desarrollo y en la actualidad sus productos tienen limitada participación en medicina convencional, encontrándose gran parte de ellos en fase de prototipo (Berthiaume F y col., 2011). El desafío plantea la generación de constructos funcionales en la sustitución de tejido necrótico o para promover la reparación de tejido dañado. Estos consisten de células que son expandidas *in vitro*, acondicionadas a través de la adición de factores de crecimiento, sobre matrices mecánicamente estables con propiedades osteoconductoras (Fig. 1), lo que resulta en una unidad biológicamente activa que restituye la función tisular al ser implantada en la región lesionada (Amini A y col., 2012; Almubarak S y col., 2016; Mishra R y col., 2016). Además del uso clínico, estos productos son de gran utilidad en el área de diagnóstico, en el estudio de enfermedades, en ensayos de biomecánica y en pruebas toxicológicas (Berthiaume F y col., 2011).



Figura 1. Los tres pilares de la ingeniería de tejidos: matriz, células y factores de crecimiento (moléculas bioactivas). La representación mediante el modelo de un “taburete de tres patas” hace alusión a los tres elementos que sustentan a la ingeniería de tejidos y como cada uno es indispensable para su estabilidad. Imagen adaptada de Mishra R y col., 2016.

El seguimiento hospitalario a largo plazo evidencia una disminución progresiva del uso de implantes y trasplantes óseos, principalmente por la complejidad de la operación y por las dolencias físicas asociadas a la obtención y reubicación del tejido sustituto. El desarrollo de injertos artificiales biocompatibles ha contribuido también a la devaluación de los métodos tradicionales (Kinaci A y col., 2014). Los injertos ortopédicos generados por ingeniería de tejidos han sido objeto de variados proyectos de optimización con el propósito de reforzar su capacidad de reparación ósea, que han apuntado al descubrimiento y selección de factores pro-angiogénicos que favorecen la formación de hueso vascularizado (Almubarak S y col., 2016; Laurencin C y col., 2014), a la exploración de biomateriales que propicien la adhesión celular y la adsorción de proteínas de la matriz ósea (Samavedi S y col., 2013), y al estudio de células troncales aisladas de diferentes tejidos, que han demostrado tener la facultad de estimular los mecanismos endógenos de renovación tisular, congrega células troncales residentes y así, promover la regeneración local de hueso (Arvidson K y col., 2011). A pesar de los avances y el progreso de esta disciplina, la ingeniería de tejidos óseos tiene pendiente

el desafío de comprender los mecanismos celulares subyacentes al proceso de diferenciación al linaje óseo en las células que utiliza como material de partida, de tal forma de aumentar la eficacia de la formación de hueso con fines terapéuticos.

1.3. Osificación y células troncales mesenquimáticas (MSC)

El proceso embriológico de formación de huesos planos, característicos de la bóveda del cráneo y de algunos componentes del viscerocráneo (palatino, maxilar y mandibular), se inicia con la agregación de células troncales de origen mesenquimático (MSC) que se especializan a osteoblastos y osteocitos. Los osteoblastos sintetizan fosfato de calcio, un componente fundamental de la matriz extracelular (ECM). Los osteocitos forman parte de la trabécula ósea, constituyen el hueso maduro y participan en el mantenimiento general del tejido. Los osteoclastos son un tipo celular derivado de macrófagos que forma parte del tejido óseo, estos se encargan de la disgregación enzimática del hueso durante el crecimiento y en caso de lesiones graves, malformaciones e hipocalcemia (Dallas S & Bonewald L, 2011).

La inducción del proceso de osteogénesis (*osteoinducción*) consiste en el reclutamiento de MSC que se diferencian a células formadoras de cartílago o hueso. Según el origen se han descrito dos tipos de osteogénesis: intramembranosa y endocondral, que no son excluyentes y pueden ocurrir simultáneamente (Fig. 2). En la osteogénesis intramembranosa, el hueso se forma directamente a partir del mesénquima por la deposición de matriz ósea mediada por osteoblastos, en cambio en la osificación endocondral las MSC forman tejido cartilaginoso mineralizado, luego el cartílago hialino es reabsorbido y reemplazado por hueso (Gawlitza D y col., 2010). Aunque son distinguidos como “hueso de membrana” y “hueso de cartílago”, la organización del tejido en el producto final es similar entre las dos vías de osificación.

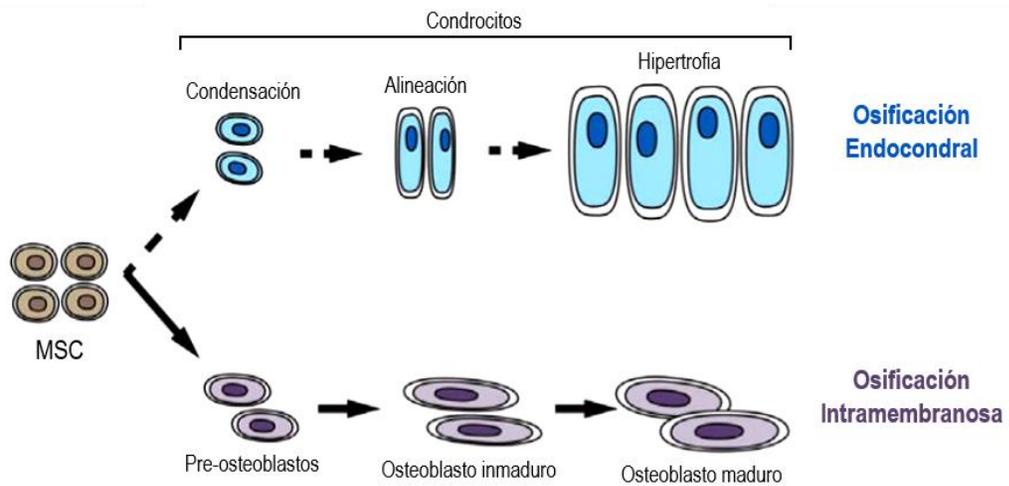


Figura 2. Vías de osificación endocondral e intramembranosa en MSC. La formación de tejido óseo puede comenzar con la diferenciación de MSC a condrocitos (osificación endocondral) o directamente a osteoblastos (osificación intramembranosa). El producto final es similar en ambos casos, aunque para propósitos de modulación *in vitro* del sistema, la inducción a osteogénesis de tipo endocondral ha entregado mejores resultados. Adaptado de Ling I y col., 2017.

La osificación a partir de MSC no está asociada exclusivamente a los primeros eventos de formación de tejido óseo, es además un proceso clave en la reparación de hueso por fractura, lesión o pérdida. Las MSC se diferencian a diferentes tipos celulares, que constituyen los tejidos óseo, cartilaginoso y adiposo (Stewart M & Stewart A, 2011). Simultáneamente, sub-poblaciones de origen idéntico se mantienen en un programa de auto-renovación permanente. Esta característica de multipotencia (Stolzing A y col., 2006) implica que, ante la eventualidad de una ruptura localizada de hueso, las MSC residentes son inducidas a diferenciarse hacia células progenitoras de hueso y cartílago, haciendo posible la restitución autónoma del tejido.

1.3.1. Expresión génica asociada al compromiso a linaje óseo en MSC

RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) es considerado el gen maestro del proceso de osteoblastogénesis, habiéndose demostrado que su delección resulta en ratones que carecen de tejido óseo (Katagiri T & Takahashi N, 2002). *RUNX2* coordina señales intracelulares que promueven la diferenciación ósea de MSC, siendo inducido principalmente por representantes de un grupo de moléculas homodiméricas pertenecientes a la superfamilia del TGF- β , las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) (Matthews S, 2005; Matsubara T y col, 2008; Cecchi S y col, 2016). Además, la expresión de *RUNX2* es regulada positiva y negativamente por factores de crecimiento, moduladores transcripcionales y hormonas, que intercomunican la diferenciación ósea con vías de señalización mayores como Wnt/ β -catenina, Notch/Delta, Indian Hedgehog (Ihh), del receptor de glucocorticoides (GR), de las hormonas de crecimiento (GH) y paratiroidea (PTH), y de esclerostina (Franceschi R y col., 2003; Franceschi R & Xiao G, 2003; Orford K & Scadden D, 2008; Hartmann C, 2009; Javed A y col, 2010; Lewiecki E, 2013; Suen P & Qin L, 2016), entre otras (Fig. 3).

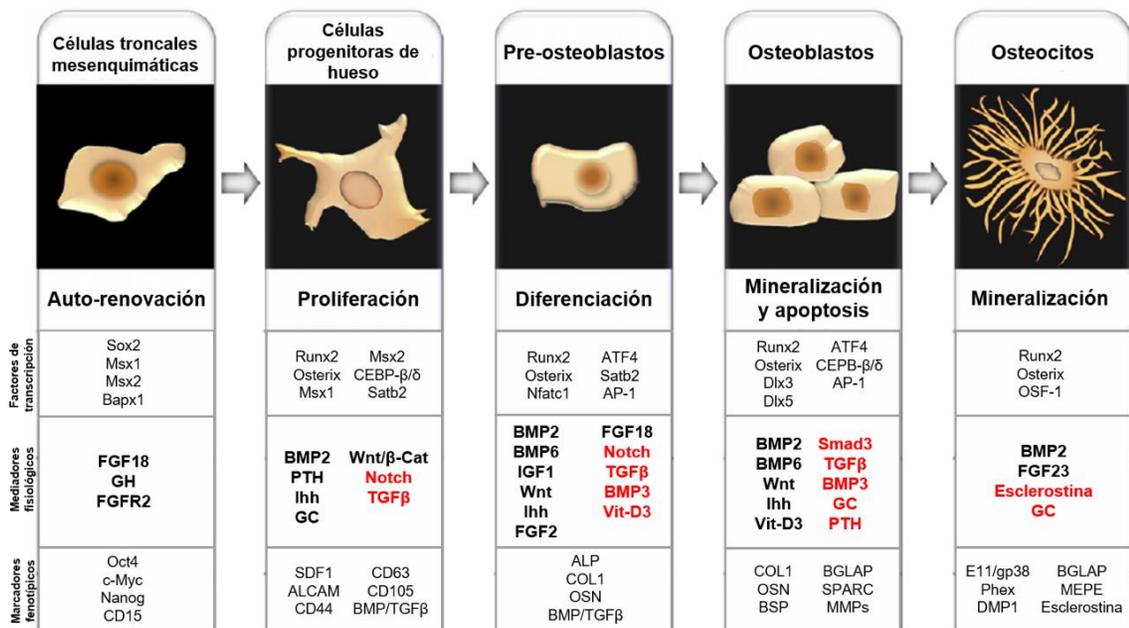


Figura 3. La diferenciación de MSC a osteoblastos y osteocitos es regulada por factores de transcripción, hormonas y moduladores fisiológicos asociados a múltiples vías de señalización. El compromiso a linaje óseo desde MSC en auto-renovación, que expresan los marcadores característicos Oct4, c-Myc, Nanog y CD15, es comandado por el factor de transcripción maestro *RUNX2*, inducido principalmente por BMP2, de manera conjunta con *SP7* (*OSX*, *Osterix*). En el proceso de especialización celular participan también las vías de señalización del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y su receptor (FGFR), de la hormona paratiroidea (PTH), de los glucocorticoides (GC), Indian Hedgehog (Ihh) y Wnt/ β -catenina, potenciando la expresión de *RUNX2*. Las vías Notch/Delta y TGF- β regulan negativamente la expresión de *RUNX2* en células progenitoras de hueso. En la etapa de pre-osteoblastos, caracterizados por la expresión de los marcadores fenotípicos ALP (*Alkaline Phosphatase*), COL1 (*Collagen Type I*) y OSN (*Osteopontin*), algunas BMPs ejercen un efecto positivo sobre la diferenciación osteoblástica, como BMP2 y BMP6, mientras que otras como BMP3 se encargan de reducir la expresión de *RUNX2*. Las vías de señalización de glucocorticoides y de PTH son contrarias al avance en el proceso de diferenciación a osteoblastos maduros, distinguidos porque expresan los marcadores *BGLAP* (*OC*, *Osteocalcin*), *COL1*, *OSN*, *BSP* (*Bone Sialoprotein*), *SPARC* (*Osteonectin*) y *MMPs* (*Matrix Metalloproteinases*). La expresión de *RUNX2* es reducida en la fase terminal de diferenciación por un mecanismo de auto-regulación, dado que su sobreexpresión inhibe la maduración de los osteoblastos formados hasta ese punto. En concordancia con lo anterior, en el estado de osteocitos maduros terminales, esclerostina (gen *SOST*) es un regulador negativo fundamental, ya que inhibe la formación de hueso y a la vía Wnt. *PHOX* es una metaloendopeptidasa vinculada a la biomineralización y a la reabsorción de fosfato en la ECM. Cuadro modificado desde Javed A y col, 2010.

En su calidad de factor de transcripción maestro, *RUNX2* induce y modula la expresión de genes óseos mediante el reclutamiento de activadores a la región promotora (Schroeder T y col, 2005). Algunos de los genes cuya expresión es directamente regulada por *RUNX2* son Osterix (*OSX, SP7*), Osteocalcina (*OC, BGLAP*), Colágeno tipo IA (*COL1A*), Fosfatasa alcalina (*ALP*), Osteopontina (*OSN, SPP1*), Osteonectina (*SPARC*) y Sialoproteína ósea (*BSP*). *BGLAP* es el único gen específico de osteoblastos maduros (Ducy P, 2000; Zoch M y col., 2016), y en base a este antecedente, el estudio de su promotor permitió determinar la existencia de una secuencia denominada OSE2 (*Osteoblast-Specific cis-acting Element 2*), la cual es reconocida por *RUNX2*, de modo que su unión activa la expresión de *BGLAP*. En la expresión de otros genes como *COL1A* y *SPP1*, dependiente de *RUNX2*, se cumple este mismo mecanismo de interacción entre *RUNX2* y la región OSE2 (Reichert J y col, 2013).

Si bien la expresión de *RUNX2* es un evento indispensable en la inducción de MSC a diferenciación osteoblástica, la sobreexpresión de *RUNX2* en etapas terminales del proceso inhibe la maduración de los osteoblastos, reduciendo la expresión de *COL1A* y *BGLAP* (Fig. 4A). En osteoblastos inmaduros, la expresión de *RUNX2* se reduce por mecanismos de auto-regulación mediados por *RUNX2* y otros factores transcripcionales como BMPs y *MSX2* (Matsubara T y col, 2008; Liu T & Lee T, 2013), la chaperona CHIP (Li X y col, 2008) y hormonas como PTH (Javed A y col, 2010). *RUNX2* es entonces, un gen osteoinductor en MSC pluripotentes, cuya función es incrementar el número de osteoblastos inmaduros y, además, de mantener dicho estado (Hartmann C, 2009; Javed A y col, 2010; Komori T, 2010). *SP7* (*Specificity protein-7*), un factor de transcripción con motivo “dedos de zinc” que interactúa de manera directa con *RUNX2*, es un gen esencial en diferenciación osteoblástica y su delección provoca errores en la osificación endocondral. En ratones *knockout* de *Runx2* no se detecta expresión de *Sp7*, sin

embargo, *Runx2* se expresa en niveles normales en ratones *knockout* de *Sp7*. En ambos casos, la formación de hueso y la expresión de genes asociados es nula (Rashid H y col, 2014). *RUNX2* y *SP7* forman un complejo molecular necesario para establecer un perfil de expresión génica que conduce a osteoblastos inmaduros, y que posteriormente se encargan de constituir la ECM. No obstante, *SP7* también participa en la diferenciación a osteoblastos a través de vías independientes de *RUNX2* (Lee M y col., 2003; Matsubara T y col., 2008; He S y col., 2014).

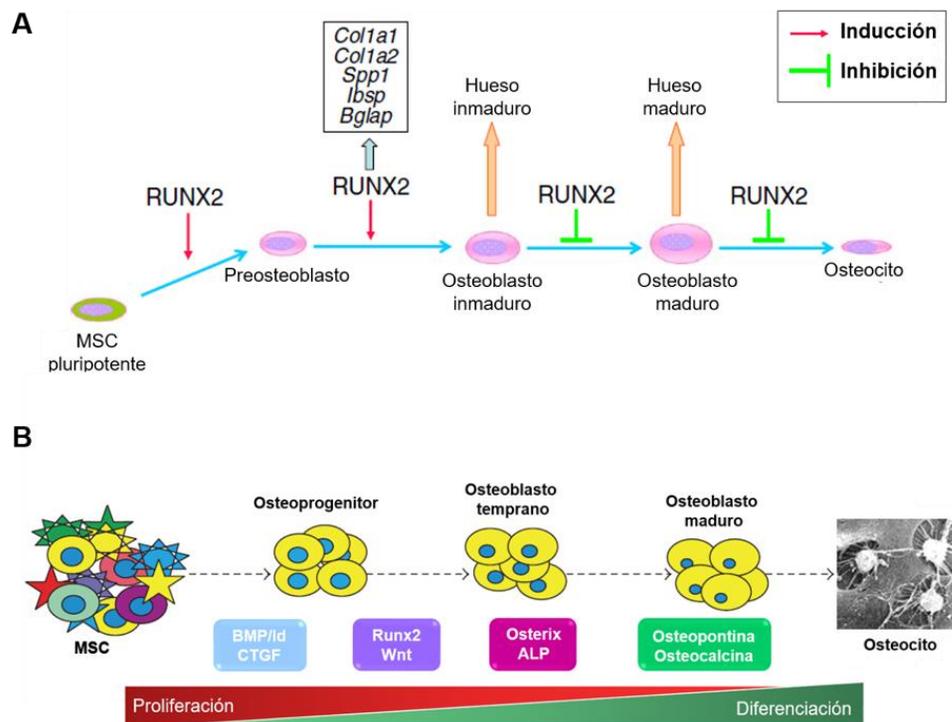


Figura 4. Regulación de la expresión génica dependiente de *RUNX2*, durante la diferenciación ósteoblástica de MSC. En su calidad de factor de transcripción maestro de la osteoblastogénesis, *RUNX2* modula la expresión de genes involucrados en la especialización celular de MSC a osteoblastos inmaduros, induciendo la actividad de *SP7* (*OSX*), *ALP*, *COL1A1* y *2*, *SPP1* (*OSN*), *BSP* (*IBSP*) y *BGLAP* (*OC*). En hueso en maduración, la expresión de *RUNX2* se auto-regula de manera negativa para formar osteoblastos maduros. Imagen modificada de Komori T, 2010 (A). *BGLAP* se expresa únicamente en osteoblastos maduros y es, por lo tanto, un marcador terminal de la diferenciación osteoblástica. Imagen adaptada desde Wagner E y col, 2011 (B).

El proceso de biomineralización consiste en la deposición de minerales en el interior o exterior de las células, lo que constituye la ECM. En tejidos duros de vertebrados se deposita fosfato de calcio o hidroxiapatita durante la formación de la ECM. El balance entre fosfato inorgánico (Pi) y pirofosfato inorgánico (PPi) es determinante para la mineralización: PPi inhibe la formación de hidroxiapatita y es hidrolizado a Pi por la enzima ALP a pH elevado (8-10). ALP es una proteína unida a membrana que se expresa en condrocitos hipertróficos y osteoblastos, y en las vesículas producidas por estas células. La expresión de *ALP* es regulada positivamente por derivados de vitamina D3 (Vit-D3) y por β -glicerolfosfato, y su inhibición trunca el proceso de mineralización *in vitro* (Orimo H, 2010). En cultivos de MSC inducidos a diferenciación osteoblástica, se reconoce una secuencia de eventos fenotípicos (proliferación, deposición de ECM enriquecida en calcio, biomineralización) y genotípicos muy similares al patrón observado durante el desarrollo óseo fetal. Sobre este último punto, destacan niveles de actividad ALP elevados (Fiorentini E y col, 2011).

1.3.2. Aplicación de MSC en reparación ósea

Es importante reiterar que la formación de hueso maduro es un proceso dependiente de la interacción entre células progenitoras y los factores que estimulan su diferenciación. El gran interés suscitado por las MSC ha motivado la investigación de los mecanismos que dirigen la diferenciación a los tres linajes mesenquimáticos, con el objetivo de modular la producción de células especializadas en función de los requerimientos del sistema de salud, con énfasis en el desarrollo de terapias celulares (Fernández-Vallone V y col., 2013).

Con el objetivo de estudiar la osteogénesis de las MSC y así lograr dirigir el proceso con fines terapéuticos, se han desarrollado métodos para inducir la diferenciación de estas

células *in vitro*. Entre los inductores de osteogénesis más potentes se encuentra la familia de BMPs (Wang R y col., 2014). BMP2 cumple un rol fundamental en osteogénesis endocondral, particularmente sobre la proliferación y maduración de condrocitos, por lo cual es indispensable para la iniciación del proceso de reparación de fracturas osteoarticulares (Mostafa N y col., 2012). BMP2 y BMP7 son utilizados en procedimientos clínicos en conjunto con biomateriales osteoconductivos, sin embargo, su efectividad no ha sido cabalmente confirmada (Biver E y col., 2013) y su uso no es siempre costo-efectivo (Nauth A y col., 2009). Dado que el promotor de *RUNX2* es un blanco transcripcional descrito en MSC, tanto de BMP2 (Lee K y col., 2000), como de BMP7 (Tou L y col., 2003), se ha evaluado el aumento en la formación ectópica de hueso producto de la sobreexpresión de estas biomoléculas reguladoras mediada por vectores virales (Xiao C y col., 2011; Zhu C y col., 2011; He X y col., 2013; Park S y col., 2015). El rendimiento asociado a la metodología de transfección viral de genes es usualmente muy alto, no obstante, la alteración de la concentración fisiológica de factores de crecimiento como las BMPs puede resultar en una desregulación nociva del metabolismo celular: la vía de señalización de BMPs es regulada por factores intracelulares, extracelulares y de membrana, y actúa mediante una vía canónica y otra no-canónica (Wang R y col., 2014).

Como estrategia alternativa, variados compuestos químicos han sido probados como inductores óseos en MSC, logrando establecer la concentración a la cual deben ser suplementados al medio de cultivo (Mosna F y col., 2010). El protocolo más utilizado en la literatura es la adición conjunta de β -glicerolfosfato, ácido ascórbico y dexametasona para la inducción de MSC humanas a diferenciación osteoblástica, en base al aumento en la actividad ALP, expresión de *BGLAP* y mineralización por calcificación (Jaiswal N y col., 1997; Langenbach F & Handschel J, 2013). La dexametasona es un glucocorticoide

sintético con poder anti-inflamatorio e inmunosupresor, es también empleada para promover la diferenciación adipogénica y condrogénica. Es capaz de aumentar la capacidad osteogénica del inductor clásico BMP2, promueve selectivamente la proliferación de células con potencial osteoblástico mayor (Yuasa M y col., 2015), y en diferenciación osteoblástica de MSC cumple la función de activar indirectamente la expresión de *RUNX2* dependiente de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Komori T, 2011). Este glucocorticoide es esencial para la mineralización terminal que se observa alrededor de los 21 días en medio de diferenciación, ya que su ausencia en la etapa proliferativa de MSC determina que no se formen agregados nodulares de fosfato de calcio, indicadores de la transformación funcional de las células *in vitro* e *in vivo*. El ácido ascórbico actúa como co-factor en la síntesis de colágeno y en la consiguiente formación de la matriz extracelular. La diferenciación osteoblástica necesita del contacto entre las células pre-osteoblásticas y la matriz extracelular rica en colágeno. En efecto, las proteínas de la matriz extracelular, COL1 y vitronectina, son suficientes para inducir a BM-MSc a diferenciación osteoblástica en ausencia de otros inductores (Langenbach F & Handschel J, 2013). β -glicerofosfato actúa como fuente de fosfato para la deposición de conjugados de calcio entre las células, hito fenotípico considerado la prueba fehaciente de una exitosa diferenciación osteoblástica (Fiorentini E y col, 2011). Además, promueve la expresión de *ALP in vitro* (Orimo H, 2010).

La diferenciación osteoblástica en MSC debe ser confirmada y evaluada en base al perfil de expresión génica de las células al término del protocolo ya que, durante la especialización a osteoblastos maduros, las células precursoras retienen una morfología prácticamente indistinguible a la de fibroblastos, lo cual dificulta establecer rasgos fenotípicos característicos (Denu R y col., 2016). La mayoría de las proteínas que expresan las células del tejido óseo son comunes a otros tipos celulares como

fibroblastos y condrocitos, siendo *BGLAP* el único gen específico de osteoblastos terminalmente diferenciados (Ducy P, 2000).

1.3.3. Modulación de la diferenciación osteoblástica en MSC

RUNX2 ha sido propuesto como blanco estratégico para la modulación de la diferenciación a linaje óseo en células multipotentes con objetivos terapéuticos, para remediar defectos óseos, fracturas y pérdidas importantes de tejido. Con el fin de potenciar la diferenciación osteoblástica en MSC, se han utilizado vectores de expresión que codifican para *RUNX2*, *SP7* y *BMP2*. Estas indagaciones han sido realizadas en MSC de tejido adiposo y médula ósea en modelos *in vitro* e *in vivo*, obteniendo resultados positivos en cuanto a la inducción de genes óseos directamente modulados por *RUNX2*, al nivel de mineralización y a la formación ectópica de hueso (Zhao Z y col., 2005; Byers B y col., 2006; Zhang X y col., 2006; Kurata H y col., 2007; Lee S y col., 2010; Lee J y col., 2011). No obstante, el uso de herramientas de ingeniería genética como plásmidos y partículas virales para el transporte de genes de interés terapéutico en humanos genera cierto rechazo, ya que están sujetos al riesgo de formar tumores o detonar una respuesta inmune persistente (Santos J y col., 2011). Además, se han reportado casos de blancos inespecíficos, mutación por inserciones *off-target* y bajos rendimientos en el uso de vectores no virales. El éxito de la terapia génica ha sido por años obstaculizado por la incapacidad de concertar efectividad y bioseguridad, en conjunto con una apropiada selección de transgenes y plataformas de transferencia (vectores). Aun al eliminar los efectos indeseados en modelos *in vitro*, los niveles de expresión *in vivo* no han sido suficientes para respaldar la aplicación terapéutica (Hollinger J y col., 2000; Karantalis V y col., 2015).

Como antecedente al seminario de título, y bajo la misma lógica de incrementar la expresión del regulador maestro *RUNX2* con el fin de aumentar el potencial osteoblástico de MSC, se confeccionó un lentivector para la sobreexpresión de *Runx2* exógeno en WJ-MSC humanas (labor conjunta del Dr. Francisco Bustos y la Dra (c) Margarita Carrasco). La transducción fue confirmada luego de 4 días por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western Blot (Fig. 5B). La expresión génica asociada a diferenciación osteoblástica fue evaluada por qPCR, en particular, los genes *SP7*, *BGLAP*, *ALP*, *BSP* (Fig. 5C). En 3 cultivos primarios independientes de WJ-MSC humanas, la sobreexpresión de *mRunx2* mediada por lentivirus resulta en un aumento significativo de la expresión de *SP7*, *ALP* y *BSP*, no así de *BGLAP*.

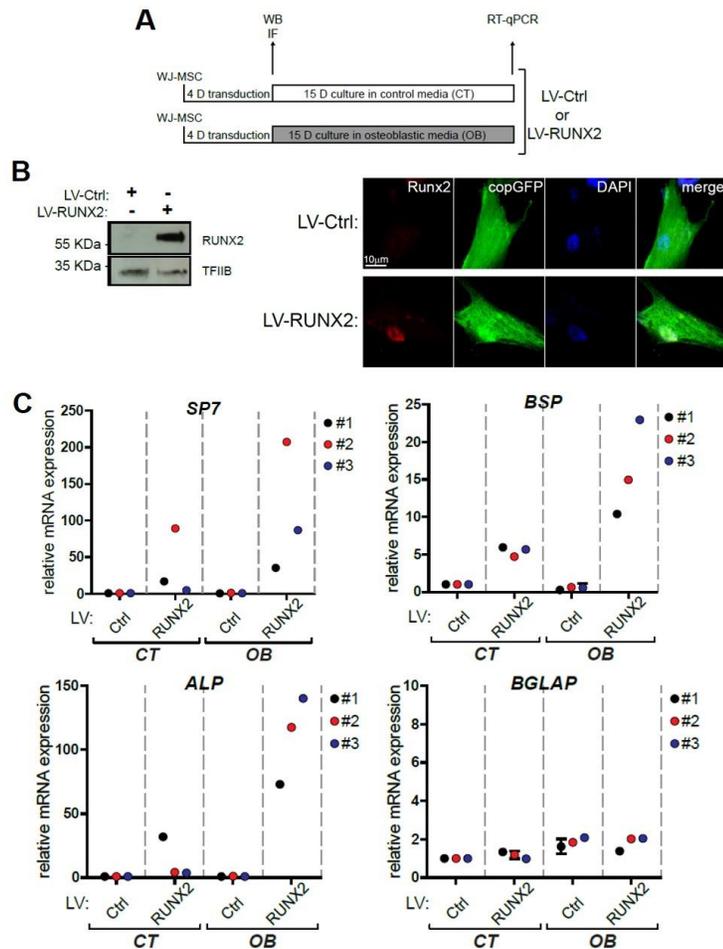


Figura 5. Sobreexpresión lentiviral de *Runx2* exógeno en WJ-MSC. Las partículas pseudovirales fueron sintetizadas en la línea celular humana HEK293FT (Thermo Fisher, R70007) por transfección de los vectores pCDH-CMV-mRunx2-EF1-copGFP (LV-RUNX2) y pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (LV-Ctrl, control) (System Biosciences), que codifican el homólogo murino, mRunx2. El título viral fue determinado según el protocolo establecido en el Laboratorio de Regulación Génica. Las WJ-MSC fueron co-incubadas con polybrene 8 µg/ml para aumentar la eficiencia de transfección y $1,25 \times 10^8$ unidades de transducción de LV-Ctrl o LV-RUNX2, y mantenidas a 32°C por 48 horas para reducir la tasa proliferativa y promover la entrada de los pseudo-virus. Luego se restableció la incubación a 37°C en medio control (CT) o medio de diferenciación osteoblástica (OB) y se ejecutó el protocolo regular de diferenciación osteoblástica en WJ-MSC por 15 días (A). La transducción lentiviral fue confirmada al día 4 (B) por Western Blot, utilizando el factor de transcripción TFIIIB como control de carga. Además, la transducción fue confirmada por Inmunofluorescencia Indirecta, en donde se observa que mRunx2 (CHERRY, rojo) co-localiza con el núcleo celular (DAPI, azul) y que copGFP se expresa ubicuamente en WJ-MSC. Al transcurrir 15 días, el análisis por qPCR de la expresión de los genes *SP7*, *BSP*, *ALP* y *BGLAP* en 3 WJ-MSC, revela un aumento significativo en la expresión de *SP7*, *BSP* y *ALP*, no así de *BGLAP* (C). Figura adaptada desde Bustos F y col., 2017 (manuscrito en revisión en *Stem Cells*).

1.3.4. Regulación epigenética de *RUNX2* en MSC

1.3.4.1. Estructura del gen *RUNX2*

El promotor P1 se ubica río arriba de la región codificante de la isoforma específica de células progenitoras de hueso *RUNX2-P57*, nombrada originalmente *MASNS/p57* (Drissi H y col., 2000). En *Mus musculus*, *Runx2* está codificado en el cromosoma 17 y se extiende por aproximadamente 210 kb. El promotor P1 abarca cerca de 0.9 kb, de donde una región interior de 0.6 kb posee los elementos mínimos para la transcripción de *Runx2-p57* (Fig. 6). En osteoblastos MC3T3 y otras células mesenquimales, se identificó una sub-región de 0.4 kb, próxima al sitio de inicio de la transcripción, que se caracteriza por su hipersensibilidad a DNAsa I. Lo anterior se asocia a un grado elevado de accesibilidad de la cromatina y concuerda con los altos niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 en estas células (Hovhannisyán H y col., 2013). En humanos, el gen ortólogo *RUNX2* posee un 94% de similitud de secuencia con su contraparte murina, tiene un tamaño aproximado de 337 kb y se localiza en el cromosoma 6 (GC06P045295 en www.genecards.org). Se expresa mayoritariamente en médula ósea y en células del linaje mesenquimático.

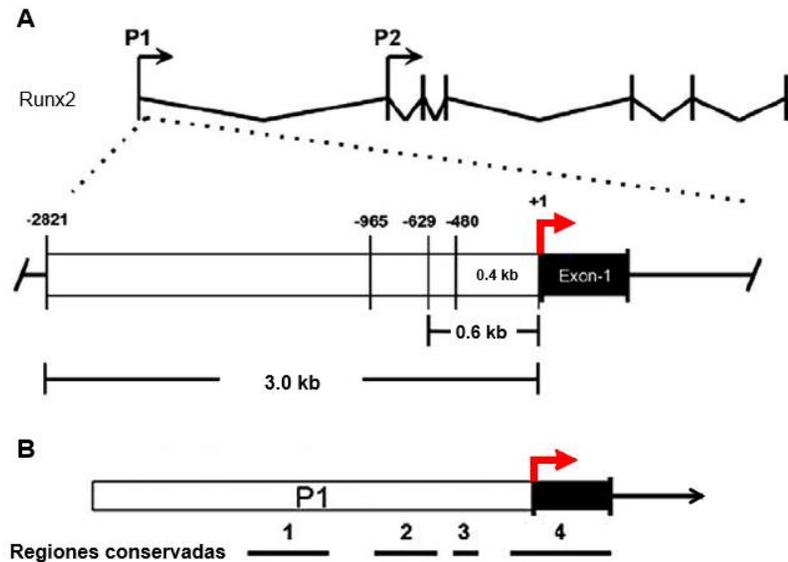


Figura 6. Estructura del gen *Runx2*. (A) Se han definido dos regiones promotoras (en dirección 5' a 3'): P1 y P2, que transcriben las dos isoformas predominantes de *Runx2*. El promotor P1 es específico del linaje osteoblástico, codifica a la proteína *Runx2-p57* y corresponde a una región de entre 0.6 y 0.9 kb (Xiao ZS y col., 2001), definida por una secuencia “núcleo” de 0.4 kb (desde -480 a -1), que fue identificada por su hipersensibilidad a la acción de nucleasas (Hovhannisyan H y col., 2013). El codón consenso ATG se ubica en +408 en el exón-1 (caja negra). La flecha color rojo indica el punto de inicio de la transcripción de *Runx2*. (B) El promotor P1 posee a lo menos siete sitios de unión de *Runx2*, y cuatro regiones de secuencia conservada. Esquemas adaptados desde Tai PWL y col., 2014.

1.3.4.2. Modificación de la cromatina en el control de la expresión génica

La epigenética es el estudio de los mecanismos que afectan la expresión génica de manera estable y potencialmente heredable sin alterar la secuencia de nucleótidos en el ADN (Vrtačnik P y col., 2014), es por ello que se considera un tipo de “memoria” genética que no involucra cambios en la información contenida en el genoma. El ADN nuclear se enrolla sobre nucleosomas, que protegen la integridad del material genético y regulan su interacción con factores de transcripción. Cada nucleosoma consiste en un octámero formado por dos copias de cada tipo de cuatro histonas basales: H2a, H2b, H3 y H4, al cual se enrollan 147 pares de bases en 1.7 vueltas alrededor del nucleosoma. Esta asociación es estabilizada por la histona H1 que interactúa directamente con el ADN

(Lodish H y col., 2000). El extremo amino terminal de las histonas es blanco de diversas modificaciones luego de la etapa de traducción, ya que queda expuesto hacia la superficie del nucleosoma. Las modificaciones post-traduccionales (PTM) son uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados e incluyen la metilación de lisinas y argininas, la acetilación de lisinas y la fosforilación de serinas y treoninas (Montecino M y col., 2015). Estas modificaciones son catalizadas por metil-transferasas (HMT), demetilinas, acetil-transferasas (HAT), deacetilasas (HDAC) y quinasas de histonas (Vrtačnik P y col., 2014).

El perfil epigenético puede definir la estructura tridimensional que adopta la cromatina. A grandes rasgos, se distinguen dos tipos de cromatina en el genoma: eucromatina “activa” y heterocromatina “silente”. Esta última se caracteriza por niveles bajos de acetilación, metilación y fosforilación, y representa una forma condensada del material genético. Por el contrario, la eucromatina presenta niveles altos de acetilación y de trimetilación de H3K4, H3K36, y H3K79, y corresponde a un estado más laxo que facilita la transcripción de genes (Zhang Y & Reinberg, D, 2006). Algunas marcas epigenéticas fueron inicialmente consignadas como “activadoras” o “represoras” de la expresión génica de manera irrefutable: H3K4me como activadora y H3K27me como represora. En general, los estudios clásicos vincularon el ADN metilado con la activación de genes. La metilación de residuos de lisina se asocia a activación en algunos casos (H3K4, H3K36, H3K79) y a represión en otros (H3K9, H3K27, H4K20); la metilación de argininas se comporta de manera similar (Kouzarides T, 2007). El resultado de la metilación depende de factores aún no dilucidados, por ejemplo, H3K36me y H3K9me tienen un efecto positivo cuando se ubican en la región codificante del gen, y un efecto negativo cuando están en el promotor (Vakoc C y col., 2005). La acetilación está asociada a una transcripción activa, y hasta la actualidad no se han reportado antecedentes que

indiquen lo contrario. Algunos investigadores atribuyen este hecho a que las HAT y HDAC son menos específicas que las HMT (Stern D & Berger S, 2000).

Las PTM son específicas en cuanto a su localización en el genoma y dinámica temporal. Si bien no existe especificidad de unión a la secuencia de ADN, las enzimas antes mencionadas son reclutadas a sitios de regulación en la cromatina en etapas tempranas del desarrollo, posteriormente durante la especialización y en células terminalmente diferenciadas. La evidencia indica que la diferenciación celular está asociada a cambios progresivos en el epigenoma, que corresponde al patrón de marcas epigenéticas (Pike J y col., 2015). El establecimiento del estado epigenético global y la articulación de funciones biológicas como la especialización de linaje, son procesos con un alto grado de organización, que proporcionan un contexto dinámico para la expresión de genes (Tessarz P & Kouzarides T, 2014).

1.3.4.3. Mecanismos epigenéticos en el compromiso a linaje osteoblástico

La diferenciación de células precursoras de hueso a osteoblastos competentes en mineralización, y finalmente a osteocitos, es regulada por variadas PTM, identificadas en su mayoría en la región promotora del factor de transcripción maestro *RUNX2*. Estudios *in vitro* han revelado que la inhibición de algunas HDAC acelera la maduración de osteoblastos, la mineralización de la ECM y la expresión de genes como *RUNX2*, *SP7*, *BGLAP*, *COL1A*, *SPP1* y *ALP*, esencialmente producto del aumento de la actividad transcripcional de *RUNX2* (Vrtačnik P y col., 2014).

Particularmente, la demetilasa JARID1B (*Jumonji AT-rich Interactive Domain 1B*), participa en la regulación epigenética de la isoforma osteo-específica de *Runx2* mediante la remoción catalítica de grupos metilo (-CH₃) desde residuos de lisina en la histona H3

en la región del promotor P1, que transcribe dicha isoforma. El silenciamiento de JARID1B en células C2C12 durante la diferenciación osteoblástica inducida por BMP2, produce un aumento de la expresión de *Runx2-p57* y de *Bglap*, así también se observa un enriquecimiento de H3K4me3 en el promotor P1. Vale decir, en células comprometidas del linaje mesenquimático, JARID1B actúa como un represor de la expresión génica de *Runx2* (Rojas A y col., 2015).

1.4. Ventajas de la aplicación de MSC en medicina regenerativa

Las MSC poseen gran potencial como vehículo de genes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades genéticas y de genes diseñados para destruir células malignas en diferentes patologías, considerando que la manipulación genética de estas células se califica como “sencilla” (Meyerrose T y col., 2010).

La combinación única de propiedades que poseen las MSC incluye una tasa de proliferación mayor a otros tipos celulares, mantienen su capacidad de diferenciación y auto-renovación a lo largo de varios pasajes en cultivo y tienen la facultad de modular el sistema inmune, ya que su expresión de moléculas de histocompatibilidad no es significativa y, además, sintetizan inhibidores de la respuesta inmune en alta concentración (Ding D y col., 2015). Esta última característica argumenta a favor de un potencial uso como reservorio de células troncales adultas no hematopoyéticas para trasplantes alógenos y medicina regenerativa (Mesples A y col., 2016). Las MSC tienen bajos niveles de expresión de *SOX2* y *OCT4*, factores de transcripción que, en conjunto con *NANOG*, forman parte de un circuito auto-regulado que controla los mecanismos de renovación celular y mantención de la pluripotencia (Schônitzer V y col., 2014; Wang J y col., 2015). Estos genes están también involucrados en la tumorigénesis y en la

promoción de la supervivencia de células tumorales (Lee A y col., 2013), razón por la cual han mermado las posibilidades de utilizar células troncales embrionarias (ESC) y células pluripotentes inducidas (iPSC) en terapia celular. Por otra parte, las MSC son aisladas desde tejido adulto derivado del mesodermo y algunos órganos extra-fetales, se concentran en microambientes denominados “nichos”, y desempeñan el rol de reserva de células progenitoras con disponibilidad inmediata (Asumda F, 2013).

El paradigma inicial sobre la capacidad regenerativa de MSC se sustentaba en su destacado potencial de diferenciación y en la facultad para reemplazar tejido necrótico o disfuncional. Estudios posteriores revelaron que el poder terapéutico de las MSC radica en la riqueza de su secretoma (Baglio S y col., 2012; Bai L y col., 2016; Konala V y col., 2016). Este contiene factores tróficos, inmunosupresores, inhibidores de apoptosis, moléculas pro-angiogénicas, y otras biomoléculas que promueven el reclutamiento y proliferación de células troncales residentes (Norambuena G y col., 2012). En respuesta a variaciones del entorno que son percibidas como adversas, la actividad transcripcional de las MSC se modifica, favoreciendo la síntesis de moléculas que participan en la producción de colágeno, activación de plaquetas, entre otros; además modulan la actividad de las células efectoras de la respuesta inmune. Una vez transferidas al paciente, las MSC migran por *quimiotaxis* al área en deterioro, que se caracteriza por altas concentraciones de factores pro-inflamatorios, pro-apoptóticos y un bajo porcentaje de oxígeno local. Este proceso de traslación es conocido como *homing* (Konala V y col., 2016).

En terapia de regeneración ósea, las MSC han demostrado ser efectivas en estudios clínicos sobre fracturas graves, desórdenes articulares y osteogénesis imperfecta (Porada C & Almeida-Porada G, 2010). Se ha establecido que la pre-diferenciación de MSC a linaje óseo previo a la aplicación terapéutica en el paciente, directamente o

formando parte de un constructo híbrido, promueve la osteointegración y acelera la reparación del tejido dañado (Song I y col., 2008; Amini A y col., 2012).

1.4.1. Células troncales mesenquimáticas del cordón umbilical

La ingeniería de tejidos óseos se mantiene en la búsqueda de fuentes celulares con propiedades óptimas para su uso en terapia regenerativa. Las MSC aisladas desde tejidos adultos proliferan a menor velocidad y se diferencian de manera menos eficiente en comparación con MSC obtenidas de tejido embrionario, extra-embrionario y fetal, que poseen mayor capacidad proliferativa y potencial de diferenciación. Las MSC adultas acumulan mutaciones en su ADN, producto de los varios eventos de replicación, lo cual dificulta su uso biomédico. Las células madre hematopoyéticas (HSC) y las MSC de médula ósea (BM-MSK) son células troncales adultas ampliamente utilizadas en terapia celular. En particular, las BM-MSK han sido utilizadas como la principal fuente celular en ingeniería de tejidos óseos, ya que tienen una predisposición genética hacia este linaje: la médula ósea contiene subpoblaciones clonales de células pre-osteoblásticas y pre-adipocíticas (Post S y col., 2008). No obstante, su obtención requiere de procedimientos invasivos y dolorosos que pueden provocar infecciones y secuelas permanentes (Wang B y col., 2013). Además, la baja cantidad de células viables que acreditan características de interés terapéutico, obtenidas en cada extracción de HSC y BM-MSK, es un factor limitante en la realización de estudios clínicos (Kern S y col., 2006). Las MSC aisladas desde tejido adiposo (AD-MSK) han ganado popularidad ya que la extracción de tejido graso se acopla a procedimientos estéticos de lipoaspiración. Sin embargo, las AD-MSK almacenan información genética responsable de diversas patologías que pueden no haber sido diagnosticadas en el paciente. Conforme a estos antecedentes, las BM-MSK

y AD-MSC no son la mejor elección para aplicaciones clínicas de regeneración ósea (Robey P, 2011; Amable P y col., 2014; Frausin S y col., 2015).

El cordón umbilical es una excelente fuente extra-embionaria de células troncales. En su estructura se distinguen las membranas amnios y sub-amnios, el estroma del conducto, una región perivascular circundante a los vasos sanguíneos, dos arterias y una vena (Fig. 7). Las células troncales perinatales se obtienen en el rango temporal “alrededor de la fecha de nacimiento”, lo que abarca desde las 20 semanas de embarazo a los 28 días del neonato. Son células multipotentes y han sido identificadas en el corion, la placenta, la zona perivascular y tejido conectivo del cordón umbilical, el amnios y en el líquido amniótico. Las células troncales de cordón umbilical y de tejidos perinatales despiertan gran interés en investigación biomédica producto de la facilidad de obtención y criopreservación, multipotencialidad, inmunogenicidad baja, potencial proliferativo elevado, y la ausencia de restricciones éticas asociadas a su uso (Witkowska-Zimny M & Wrobel E, 2011).

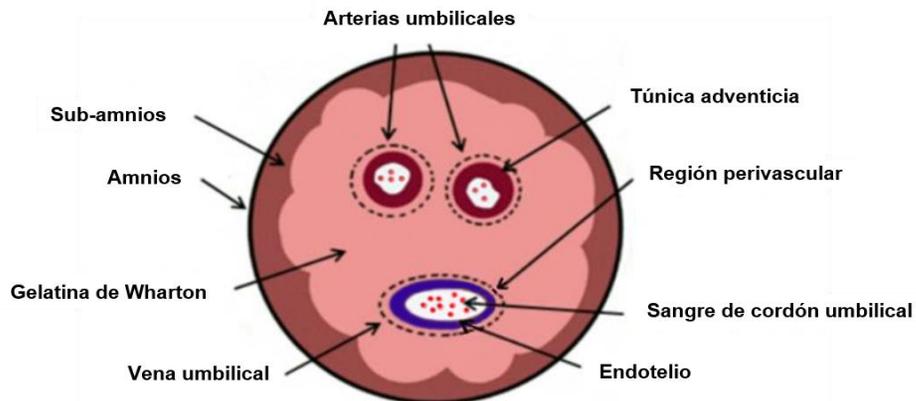


Figura 7. Ilustración de un corte transversal de cordón umbilical humano que muestra sus elementos y regiones características. El cordón umbilical es un órgano extra-embionario que funciona como conducto para el transporte de sangre, oxígeno, nutrientes y desechos entre la madre y el embrión o feto. Está formado por vasos sanguíneos, dos arterias y una vena, tejido conectivo intervascular denominado gelatina de Wharton, y delimitado por las membranas sub-amnios y amnios. Imagen modificada de Kim D, 2013.

Las células multipotentes perinatales son catalogadas como MSC acorde a la definición operacional convenida por *The International Society for Cellular Therapy* ISCT (Dominici M y col., 2006) y a la clasificación de la *International Society for Stem Cell Research* ISSCR (De Almeida D y col., 2016). Al mismo tiempo, se sostiene que manifiestan rasgos intermedios entre pluripotencia y multipotencia (Fig. 8), razón por la cual son fuertes contendientes frente a MSC adultas para potenciales aplicaciones en regeneración de tejidos (Pappa K & Anagnou N, 2009).

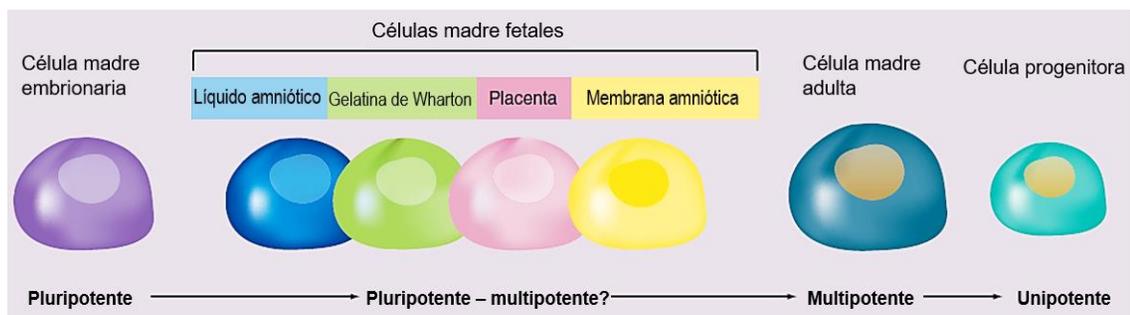


Figura 8. Potencia celular de las células troncales fetales (líquido amniótico, gelatina de Wharton, placenta y membrana amniótica). Las WJ-MSC manifiestan rasgos característicos de células multipotentes adultas, y retienen algunas capacidades biológicas de células troncales embrionarias. Imagen adaptada de Pappa K & Anagnou N, 2009.

1.4.1.1. MSC derivadas de la Gelatina de Wharton

La gelatina de Wharton corresponde al tejido conectivo intervacular o estroma del cordón umbilical, y constituye una red tridimensional formada por miofibrillas de colágeno y glicoproteínas entrelazadas con mucopolisacáridos. En ella se identificó una población celular que fue originalmente clasificada como miofibroblastos (Nanaev A y col., 1997). Estudios posteriores demostraron que estas células con morfología fibroblastoide expresan marcadores característicos de MSC (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105), y se diferencian a tejido adipogénico, osteogénico y condrogénico (Wang H y col., 2004). Fueron denominadas Células Troncales Mesenquimáticas derivadas de la Gelatina de

Wharton de cordón umbilical (WJ-MSC) y se consideran las mejores candidatas como fuente celular para regeneración tisular, terapia génica, ingeniería de tejidos mediante injertos híbridos, y otras aproximaciones terapéuticas (Nekanti U y col., 2010; Subramanian A y col., 2015; Oliver-Vila I y col., 2016; Batsali A y col., 2017). Su uso en medicina regenerativa es respaldado por estudios exploratorios en miocardiopatías (Corrao S y col., 2013), trastornos neurodegenerativos (Frausin S y col., 2015), enfermedades hepáticas (Zhang L y col., 2015) e ingeniería de tejidos óseos (Kalaszczynska I & Ferdyn K, 2015). Se han obtenido resultados promisorios en la aplicación clínica de WJ-MSC en daño a nervios periféricos, reparación de tejido conectivo, obesidad y diabetes (Watson N y col., 2015). Es importante precisar que la obtención, manipulación y aplicación clínica de WJ-MSC no tiene contraindicaciones bioéticas, ya que el cordón umbilical es considerado un desecho clínico derivado de una práctica quirúrgica habitual (Wobus A & Boheler K, 2005). Otro aspecto ventajoso del uso de WJ-MSC en investigación es que, por lo general, el volumen de tejidos extra-embrionarios supera con creces al que se obtiene a partir de tejidos adultos y se tiene que desde un cordón umbilical humano se aíslan en promedio 400.000 WJ-MSC (Marcus A & Woodbury D, 2008). Con respecto a MSC derivadas de otras zonas perinatales, las WJ-MSC parecen ser la fuente celular óptima para propósitos terapéuticos debido a su potencial de diferenciación osteoblástico comparativamente mayor (Zajdel A y col., 2017).

Por otro lado, el secretoma de las WJ-MSC está enriquecido en factores de crecimiento, los principales efectores de las vías de señalización que regulan importantes funciones celulares. Las actividades mitogénica, pro-angiogénica y anabólica del secretoma de WJ-MSC son mayores a las encontradas en BM-MSC y AD-MSC (Amable P y col., 2014). Las WJ-MSC estimulan la proliferación de células aledañas mediante factores paracrinos

y contribuyen en la homeostasis del microambiente que conforman. Sus exclusivas propiedades anti-inflamatorias y de inmunomodulación comprenden un alto nivel de expresión de las moléculas de adhesión CD54 y CD146, la secreción de altas concentraciones de las quimioquinas RANTES, MCP-1 e IP-10, la expresión de HLA-G que induce la proliferación de células T reguladoras y suprime la expansión de células T citotóxicas y NK (acrónimo del inglés Natural Killers), y la ausencia de ligandos activadores de linfocitos B y T (Watson N y col., 2015). Lo anterior les permite moderar la respuesta inflamatoria y ser toleradas por el sistema inmune. Por consiguiente, abren la posibilidad de constituir un reservorio alogénico universal de células troncales (banco de MSC) para propósitos de ingeniería tisular, medicina regenerativa y terapia celular. Los protocolos de trabajo con WJ-MSC *in vitro* e *in vivo* se encuentran implementados en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Células Troncales de la Dra. Verónica Palma (Edwards S y col., 2014). Los cordones umbilicales son recepcionados desde el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Luis Tisné Brousse, acorde a las directrices del comité de Ética de dicha institución. Además, se cuenta con la aprobación del comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y el comité Asesor de Bioética de FONDEF/Conicyt para el proyecto D09E1047. Cada cordón umbilical es entregado bajo consentimiento informado por pacientes con historia clínica íntegra, estado de salud pre-gestacional y gestacional normal, embarazo a término completo y sin patologías neonatales detectadas en las pruebas inmediatamente posteriores al nacimiento por cesárea.

1.4.1.2. Cambios en el perfil epigenético de *RUNX2* en WJ-MSC durante la diferenciación osteoblástica

En el marco de la colaboración entre el laboratorio de la Dra. Verónica Palma y el laboratorio del Dr. Martin Montecino (UNAB), se determinó en investigaciones previas que en WJ-MSC indiferenciadas el promotor P1 de *RUNX2* presenta bajos niveles de marcas epigenéticas asociadas a una activa transcripción génica, particularmente H3K4me3 y H3K27ac. Sin embargo, al ser inducidas a diferenciación osteoblástica, se observó que tempranamente se produce un enriquecimiento significativo de estas modificaciones en el promotor P1, develando la activación transcripcional de *RUNX2* (Sepúlveda H y col., 2016). Por otra parte, en células murinas C2C12 se describió la participación de JARID1B en la represión transcripcional de *Runx2-p57*, de modo que el *knockdown* (silenciamiento génico) de JARID1B resultó en un aumento significativo de la expresión de *Runx2* y *Bglap*, en coherencia con el incremento de H3K4me3 en el promotor P1 (Rojas A y col., 2015). En conjunto, estos antecedentes conducen a proponer a JARID1B como blanco para modular de manera indirecta la diferenciación osteoblástica en WJ-MSC.

Como alternativa al silenciamiento de JARID1B mediado por virus, se indagó en el uso de la benzisotiazolinona PBIT (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/935415>), un potente inhibidor de la actividad enzimática de todos los miembros de la familia de demetilinasas de histonas con dominio Jumonji/ARID, que inhibe a JARID1B en un 95% con un valor de IC₅₀ de 3 µM (Sayegh J y col., 2013). Este compuesto es sintetizado por *Mycobacterium tuberculosis* y fue identificado como un inhibidor de la salicilato sintasa (Vasan M y col., 2010). Es una molécula capaz de permear la membrana plasmática sin generar estrés celular, de atravesar la membrana nuclear y de frenar la proliferación de células que expresan JARID1B en alta concentración (Sayegh J y col., 2013), atributos

interesantes a favor de un potencial uso en la modificación de células para propósitos terapéuticos.

En base a la evidencia recopilada, el presente seminario de título pretende evaluar la efectividad de la inhibición farmacológica de un regulador epigenético que es clave en diferenciación osteoblástica de MSC, ya que modula la expresión del gen maestro *RUNX2*, como metodología para aumentar el potencial osteoblástico de WJ-MSC. Se postula que este procedimiento resulte comparable a técnicas clásicas de manipulación genética, que garantizan altos rendimientos como la transducción lentiviral.

1.6. Hipótesis

La modulación de la expresión del factor de transcripción maestro de la osteoblastogénesis *RUNX2* por medio de la inhibición farmacológica de su represor epigenético JARID1B, incrementará el potencial de diferenciación osteoblástica en cultivos primarios de WJ-MSC.

1.7. Objetivo general

Evaluar la regulación epigenética de *RUNX2* mediada por el fármaco inhibidor PBIT en cultivos primarios de WJ-MSC, como metodología *in vitro* para el incremento del potencial de diferenciación osteoblástica.

1.8. Objetivos específicos

- 1) Estudiar la unión de JARID1B al promotor P1 de *RUNX2-P57* en cultivos primarios de WJ-MSC en medio control y medio de diferenciación osteoblástica.
- 2) Evaluar la modulación de la expresión de *RUNX2* producto de la acción temprana del inhibidor farmacológico PBIT, en cultivos de WJ-MSC en diferenciación osteoblástica y condiciones control.
- 3) Evaluar el potencial osteoblástico de WJ-MSC transducidas con lentivirus para el silenciamiento de JARID1B.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivo celular

Los cultivos primarios de WJ-MSC obtenidos desde cordón umbilical humano, identificados mediante un código numérico, son preservados en tambores de nitrógeno líquido a -80°C en crioviales con medio de congelación acorde al protocolo implementado en el laboratorio (Edwards S y col., 2014). Para el desarrollo de este seminario de título se trabajó sólo con crioviales de WJ-MSC de cultivos previamente validados en su carácter multipotente, de manera independiente en el laboratorio.

El cultivo de WJ-MSC fue realizado en medio de crecimiento: DMEM alta glucosa (Gibco) pH 7.2, Suero Fetal Bovino (HyClone) 10% y antibióticos Penicilina/Estreptomicina 100 U/ml (Gibco) 1%. Las condiciones de incubación (HEPA Class 100 Thermo Scientific Forma Series II y III) fueron de 37°C de temperatura, 95% de humedad, 5% de dióxido de carbono y 21% de oxígeno. Al alcanzar un 90% de confluencia celular estimada por observación directa en microscopio óptico, fueron realizados 2 lavados con PBS 1X (preparado desde PBS 10X pH 7.4 Gibco) temperado y luego, las células fueron tratadas con una solución 2X de tripsina 0,025% (Gibco) en PBS 1X por 8 minutos a 37°C , para ser expandidas en las condiciones de cultivo descritas previamente. El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas.

Para los ensayos fueron sembradas en promedio 10^4 - 10^5 células/cm², en pasajes bajos (sub-cultivos 3 y 4). Dada la heterogeneidad inherente al hecho que se trabaja con cultivos primarios de WJ-MSC, en cada ensayo se emplearon a lo menos 3 cultivos diferentes. Como referente se utilizó la línea celular de osteosarcoma Saos-2 (*Sarcoma Osteogenic*, ATCC® HTB-85™), cultivadas en las mismas condiciones.

2.2. Diferenciación osteoblástica

El medio de diferenciación (OM, *Osteoblastic Medium*) fue preparado a partir de medio de crecimiento suplementado con 10 mM β -glicerolfosfato (Merck), 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ácido ascórbico y 0,1 μM dexametasona (ambos Sigma-Aldrich) acorde a lo establecido y validado en trabajos previos (Mosna F y col., 2010; Fiorentini E y col., 2011; Edwards S y col., 2014). El medio de crecimiento fue designado como medio control (CM, *Control Medium*), con respecto a OM. Se realizaron ensayos a corto y largo plazo: los primeros corresponden a un máximo de 4 días a partir de la inducción con OM, mientras los segundos se extendieron hasta 20 días de diferenciación, de acuerdo con el protocolo descrito en la literatura consultada (Jaiswal N y col., 1997; Karahuseyinoglu S y col., 2007; Gauthaman K y col., 2011). En ambos casos, CM y OM, el medio fue renovado cada 48 horas.

2.3. Tratamiento farmacológico

2.3.1. Determinación de la dosis óptima de PBIT en WJ-MSK

Para establecer un protocolo de inhibición farmacológica efectiva, en primera instancia se determinó la dosis del inhibidor PBIT (Cayman Chemical, en DMSO) a emplear en ensayos con WJ-MSK. La especificidad de inhibición descrita para JARID1B en la bibliografía corresponde a un IC_{50} de 3 μM *in vitro*, y se señala que para JARID1A y JARID1C, los valores son 6 y 4.9 μM , respectivamente. En células HeLa tratadas con 10 y 30 μM de PBIT, no se registró toxicidad. En cambio, se observó elevada mortalidad celular en cultivos de UACC-812 expuestos a 10 μM , y mínima toxicidad en células MCF7 y MCF10A, bajo el mismo tratamiento (Sayegh J y col., 2013).

Dado que la familia de proteínas JARID1 posee blancos distintos a histonas metiladas de la cromatina, que cumplen un rol fundamental en el crecimiento celular (Sayegh J y

col., 2013), y en conjunto con los antecedentes presentados, se decidió examinar el efecto de PBIT en WJ-MSC en dosis única de 3, 10 y 30 μM por 48 horas en CM y OM (Fig. 9). La toxicidad de los tratamientos fue evaluada mediante el ensayo de viabilidad celular con azul de tripán (Trypan Blue Solution 0.4%, Gibco #15250061) sobre la cámara de Neubauer (Hausser Scientific) y visualizado por microscopio óptico de luz. La exposición a PBIT 30 μM produjo la muerte de prácticamente la totalidad de las células, a diferencia del tratamiento con 10 μM que provocó menor toxicidad. En cultivos tratados con PBIT 3 μM se obtuvo un bajo nivel de muerte celular, aunque fácilmente distinguible de los cultivos control en los que se agregó un volumen equivalente de DMSO. Se escogió entonces, continuar con la concentración de 3 μM y explorar valores menores, por ende, se realizaron nuevos ensayos con PBIT 1 y 3 μM . Se determinó que, en función del efecto sobre la integridad de las células, la concentración de PBIT 1 μM por 48 horas en dosis única es la fórmula idónea para ensayos a corto plazo. Esto fue posteriormente ratificado en cuanto a la modulación de la expresión de *RUNX2-P57* mediante análisis por qPCR.

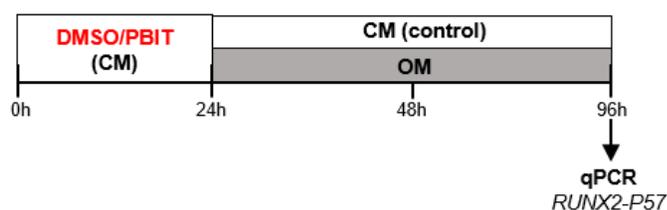


Figura 9. Determinación de la dosis óptima del inhibidor PBIT en WJ-MSC en ensayos a corto plazo. Fueron sembradas aproximadamente 100.000 WJ-MSC totales y mantenidas a 37°C hasta alcanzar confluencia media. Se agregó PBIT a concentraciones de 0, 1, 3, 10 y 30 μM , y un volumen equivalente del vehículo DMSO. Luego de 24 horas, el medio de cultivo fue renovado (CM) o sustituido por OM para inducir la diferenciación osteoblástica. El resultado fue evaluado por qPCR para *RUNX2-P57*, y *GAPDH* como calibrador, en todos los casos.

Estos ensayos preliminares a corto plazo fueron realizados en los cultivos 17T, 37T, 40T, 49T, 58T y 59T, donde cada condición fue evaluada en a lo menos dos cultivos diferentes

en el mismo pasaje, y los efectos de cada concentración fueron comparados con respecto al control correspondiente del mismo cultivo. En todas las pruebas, fueron sembradas 10.000 WJ-MSC por pocillo de 10 cm², y los resultados fueron observados bajo el microscopio óptico. Una vez establecida la dosis óptima de PBIT 1 μM, se evaluó la expresión de *RUNX2-P57* por qPCR. Efectivamente, el tratamiento farmacológico en WJ-MSC inducidas a diferenciación osteoblástica, resultó en un incremento de la expresión relativa del ARNm de *RUNX2-P57* cercano al doble, con respecto al uso de DMSO en OM, luego de 48 horas (Fig. 16 en Resultados).

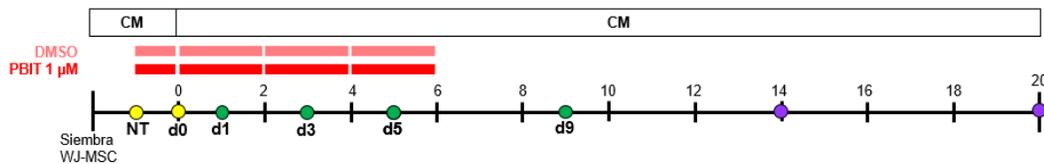
2.3.2. Protocolo de inhibición farmacológica a corto y largo plazo

Las células fueron sembradas en CM a una densidad aproximada de 10.000 por cm² e incubadas por 24 horas a 37°C. Este estado inicial de células intactas en medio de crecimiento fue definido como *No Tratadas* (NT). Se añadió la dosis establecida de PBIT 1 μM al medio de cultivo, a modo de pre-tratamiento, mientras que al grupo control se agregó DMSO en idéntico volumen. Luego de 24 horas (d0), se procedió a la inducción a diferenciación osteoblástica con OM (Fig. 10B) o a la renovación de CM (Fig. 10A), adicionando una dosis de PBIT 1 μM o DMSO. Los medios de cultivo fueron renovados cada 48 horas, suplementando con PBIT 1 μM o DMSO sólo hasta d4 en ensayos a largo plazo (20 días de diferenciación). Posteriormente se continuó con la renovación de los medios de cultivo de manera normal.

Los análisis por qPCR fueron realizados con muestras colectadas en NT, d0, d1, d3, d5 y d9 para evaluar la expresión de *RUNX2-P57*. Los puntos d1, d3, d5 y d9, fueron analizados por Western Blot para las proteínas *RUNX2*, *H3* y la modificación H3K4me3. En etapas tardías, d14 y d20, fue evaluada la mineralización por deposición de sales de calcio, mediante el ensayo de tinción con Alizarin Red S y la cuantificación de calcio utilizando un kit comercial (Calcium Colorimetric Assay Kit, #K380-250 BioVision). Los

cultivos de WJ-MSC empleados para ensayar y establecer definitivamente el tratamiento farmacológico durante la diferenciación osteoblástica a largo plazo fueron 67T, 68T, 84T, 86T, 87T, 88T, 90T.

A. Control de diferenciación osteoblástica



B. Ensayo de diferenciación osteoblástica

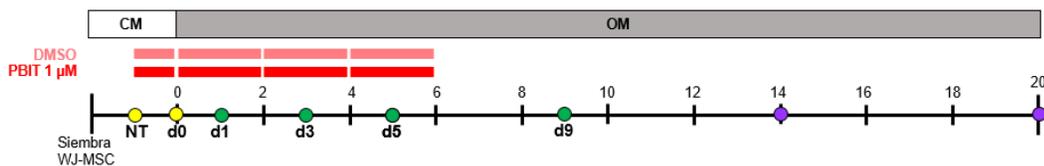


Figura 10. Protocolo experimental de inhibición farmacológica a largo plazo en WJ-MSC.

Luego de 24 horas de asentamiento posterior a ser sembradas, fue colectada la muestra NT (*No Tratadas*) para qPCR, y las WJ-MSC fueron co-cultivadas con una dosis de PBIT 1 μM, o un volumen equivalente de DMSO, en CM. 24 horas después, fue colectada la muestra d0 (*día cero*) para qPCR y Western Blot. Además, el medio fue renovado (CM) en la curva control (A) o cambiado por OM para inducir la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC (B). El tratamiento con PBIT 1 μM consistió en 4 dosis del inhibidor, o del vehículo DMSO, en conjunto con los cambios de medio de cultivo, cada 48 horas. Los días 1, 3, 5 y 9, fueron evaluados por qPCR y Western Blot para las 4 condiciones experimentales. Los días 14 y 20 fueron evaluados por tinción con Alizarin Red S y cuantificación de calcio.

2.4. Ensayos de silenciamiento de JARID1B

La transducción de WJ-MSC con virus *short-hairpin RNA* comercial fue ejecutada según el protocolo descrito previamente para pCDH-mRunx2-GFP (Fig. 5), adaptado a un ensayo corto, dado que la sobrevivencia de WJ-MSC disminuyó considerablemente producto de la transducción. La concentración de las partículas virales shJ1B1 y shJ1B2 indicada por el proveedor Sigma Aldrich, no correspondía a la concentración real de virus competentes para transducir efectivamente a WJ-MSC, por lo cual debió ser re-estimada por qPCR (Bustos F y col., 2017, en revisión) antes de comenzar los ensayos (ver Tabla

1). Las WJ-MSC fueron co-incubadas con la combinación de shJ1B1 y shJ1B2 en proporción 2:3, respectivamente, obteniendo en total $12,5 \times 10^6$ unidades de transducción por ml. El grupo control fue tratado con $12,5 \times 10^6$ unidades por ml de MISSION TRC2 pLKO.5-puro Non-Target shRNA Control Transduction Particles (Sigma Aldrich). Las WJ-MSC transducidas, con virus *knockdown* y control, junto con WJ-MSC que no fueron expuestas a vectores de transducción, fueron incubadas a 32°C por 48 horas y luego a 37°C por 24 horas. En este punto se obtuvieron muestras para confirmar la disminución de JARID1B vía Western Blot y evaluar el nivel de expresión basal de *RUNX2-P57* por qPCR. El medio de cultivo fue renovado, obteniendo así cultivos no-inducidos e inducidos a diferenciación osteoblástica. Las muestras para qPCR fueron colectadas luego de 48 horas.

Tabla 1. Partículas lentivirales *short hairpin RNA* utilizadas en los ensayos de silenciamiento de JARID1B en WJ-MSC.

Nombre	Código	Secuencia horquilla	Lote	TU/ml ^a	Copias/ml ^b
shJ1B1	TRCN0000358504	CCG GGT GCC TGT TTA CCG AAC	2015	$4,7 \times 10^7$	$6,2 \times 10^8$
		TAA TCT CGA GAT TAG TTC GGT AAA CAG GCA CTT TTT G	2016	$1,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$
shJ1B2	TRCN0000329952	CCG GAT CGC TTG CTT CAT CGA	2015	$3,7 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$
		TAT TCT CGA GAA TAT CGA TGA AGC AAG CGA TTT TTT G	2016	$1,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$

^aConcentración de partículas lentivirales shJ1B1 y shJ1B2 indicadas por el proveedor en la ficha técnica del producto, expresada como Transduction Units (Unidades de Transducción) por ml.

^bConcentración efectiva de partículas lentivirales infectivas, determinada en el laboratorio por qPCR, expresada como Copias por ml.

2.5. Análisis por PCR cuantitativo

Para evaluar el nivel de expresión relativa de los genes asociados a diferenciación osteoblástica en WJ-MSC, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X frío y mantenidas en hielo. Luego, el ARNm total fue extraído con $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ de TRIzol (Thermo Fisher Scientific), 0.2 volúmenes de cloroformo, 0.5 volúmenes de isopropanol y 1 ml de etanol 75%, según lo descrito en la literatura (Rio D y col., 2010). La concentración de ARN en cada muestra fue cuantificada en el equipo Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant

microplate reader, que mide la absorbancia a 260 nm. En la síntesis de ADN complementario (ADNc) se emplearon 1-2 µg de ARN por muestra y agua libre de RNAsas hasta un volumen máximo de 9,5 µl. Posteriormente, el RNA fue denaturado a 72°C por 5 minutos, en presencia de 0,25 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente se añadieron 10 µl de la mezcla de reacción, que contiene 100 unidades enzimáticas de M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (Promega), 20 unidades de RNaseOUT (New England Biolabs) y dNTPs 0,5 Mm (Life Technologies). La reacción de retrotranscripción transcurre por 1 hora a 37°C en termociclador, luego de lo cual cada muestra fue diluida a volumen total de 100 µl con agua libre de RNAsas y fueron analizadas por el sistema Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix Mx3000P (Agilent technologies), con los partidores específicos y estandarizados para los genes de interés (Tabla 2).

Tabla 2. Partidores utilizados en análisis por PCR cuantitativo.

Gen	Secuencia
<i>hGAPDH</i>	Fw: AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG Rv: AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC
<i>hJARID1B</i>	Fw: GAA GAC CGG CTA CTG TTG TG Rv: AGC CAA ATG CTT CTT GTG GC
<i>hRUNX2-P57</i>	Fw: GTC ACT GTG CTG AAG AGG CT Rv: GGT TAA TCT CCG CAG GTC AC
<i>hALP</i>	Fw: GAC AAG AAG CCC TTC ACT GC Rv: AGA CTG CGC CTG GTA GTT GT
<i>hBSP</i>	Fw: AGA ACC ACT TCC CCA CCT TT Rv: AGG TTC CCC GTT CTC ACT TT
<i>hSP7</i>	Fw: GCCAGAAGCTGTGAAACCTC Rv: TGATGGGGTCATGGTGTCTA

En todos los casos, se realizó en análisis de muestra por triplicado, mientras que los genes *housekeeping* se hicieron por duplicado. Las condiciones de reacción para cada gen analizado se especifican en la Tabla 3. El software MxPro QPCR entrega el valor de Ct para cada muestra, estos fueron transformados para obtener la expresión relativa de

ARNm de los genes evaluados en las muestras, normalizada con respecto al gen *housekeeping*, mediante el método de cuantificación $\Delta\Delta C_t$ (Bookout A y col., 2006).

Tabla 3. Condiciones de reacción en el análisis por PCR cuantitativo.

Gen	Volumen componentes ^a [μ l]				Contenido por tubo (20 μ l)		
	Buffer 2X	Partidor Forward	Partidor Reverse	Agua	Volumen de mix [μ l]	Volumen de muestra [μ l]	Temperatura annealing [$^{\circ}$ C]
<i>hGAPDH</i>	10	0,7	0,7	7,6	19	1	60
<i>rRPL29</i>	10	1,2	1,2	5,6	18	2	55
<i>hRUNX2-P57</i>	10	0,8	0,8	3,4	15	5	55
<i>hJARID1B</i>	10	0,6	0,6	5,8	17	3	60
<i>hALP</i>	10	1	1	5	17	3	60
<i>hBSP</i>	10	1	1	5	17	3	60
<i>hSP7</i>	10	1	1	5	17	3	62

^a Para 1 muestra (1X)

2.6. Extracción de proteínas nucleares y análisis por Western Blot

2.6.1. Colección de muestras y aislamiento de proteínas nucleares

El protocolo de fraccionamiento subcelular fue ejecutado en base a la adaptación del Laboratorio de Regulación Génica (Bustos F y col., 2017, en revisión). Brevemente, las muestras fueron colectadas con 1% de inhibidores de proteasas en PBS 1X frío, luego fueron centrifugadas por 5 minutos a 4 $^{\circ}$ C a velocidad de 4000 rpm. El pellet obtenido fue resuspendido e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente en 5 volúmenes del buffer hipotónico A (10 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM HEPES pH 7,8 y 1% de inhibidores de proteasas). Con un homogenizador manual de pistilo plástico, cada muestra fue sometida a ruptura celular mecánica y luego fueron centrifugadas por 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C a velocidad de 4000 rpm, para obtener la fracción nuclear (pellet) y citoplasmática (sobrenadante). Para purificar los nucleosomas y otras proteínas de la cromatina, el pellet fue resuspendido en 3 volúmenes de buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) hasta observar

un aumento en la viscosidad de la muestra, que indica la liberación de cromatina desde los núcleos. Las muestras fueron sonicadas a máxima potencia por un total de 5 minutos con intervalos ON/OFF de 30 segundos en el equipo OMNI-Ruptor 4000. Posteriormente fueron cuantificadas por medio del kit colorimétrico DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.6.2. Western Blot

Para la separación electroforética en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), se emplearon concentraciones de 12 y 18% para el gel separador, según correspondiese, y 5% para el gel concentrador. Fueron cargados 30 µg de cada muestra con buffer de carga 6X (70% Tris-HCl 1 M pH 6.8, 30% glicerol, SDS 0.1 g/ml, azul de bromofenol 0.12 mg/ml y 5% β-mercaptoetanol), previamente denaturadas en termoplaca a 95°C por 5 minutos, y 7 µl del marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#26616, Thermo Scientific). La fase de concentración se llevó a cabo por 15 minutos a voltaje 70 V y la fase de separación se extendió por cerca de 2 horas a 100 V. En el programa de transferencia semi-húmeda a 150 V por 30 minutos en el equipo Trans-Blot Turbo(Bio-Rad), se utilizaron membranas de nitrocelulosa 0,45 µm que fueron posteriormente incubadas a temperatura ambiente con una solución de Rojo Ponceau 0,1% en ácido acético 5%, para verificar la transferencia de proteínas desde el gel. La tinción fue removida con PBS-T (0,05% Tween 20 en PBS 1X), para luego proceder a incubar las membranas por 1 hora con solución de bloqueo (5% leche descremada en PBS-T) a temperatura ambiente con agitación suave. Después del bloqueo, las membranas fueron incubadas durante la noche con los anticuerpos primarios respectivos (Tabla 4), preparados en una solución de PBS-T con 1% de leche descremada, a 4°C y en agitación suave. Luego de recuperar el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas con PBS-T e incubadas en agitación por 2 horas a temperatura ambiente con su correspondiente anticuerpo secundario (Tabla 4) en leche descremada al 1%. La

solución de anticuerpo secundario fue removida y las membranas fueron lavadas con PBS-T.

2.6.3. Revelado por quimioluminiscencia

Los resultados fueron obtenidos por quimioluminiscencia con los kits de detección de alta sensibilidad SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (#34087) y SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (#34095) (ambos Thermo Scientific) en el sistema UVITEC Alliance 9.7 y fotodocumentados por el mismo equipo.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la detección de proteínas por Western Blot.

Anticuerpos primarios		
Proteína blanco	Proveedor y número de catálogo	Dilución
RUNX2	Presente del Dr. Gary Stein, USA	1:2000
KDM5B/PLU1/JARID1B	Abcam, ab198884	1:1000
LAMINB1	Abcam, ab16048	1:5000
TFIIB	Santa Cruz Biotechnology, sc-225	1:3000
H3	Abcam, ab1791	1:5000
H3K4me3	Abcam, ab8580	1:5000
Anticuerpos secundarios		
HRP-conejo	Santa Cruz Biotechnology, sc-2004	1:5000
HRP-ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-2005	1:3000

2.7. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Las WJ-MSC fueron fijadas con PFA 4% por 20 minutos, luego fueron permeabilizadas con 0,1% Tritón X-100 en PBS 1X por 5 minutos y finalmente bloqueadas con 3% BSA por 30 minutos. Posteriormente, fueron incubadas con anticuerpo anti-JARID1B 1:500 o con anticuerpo anti-RUNX2 1:1000, por 1 hora. Luego, fueron incubadas por 1 hora con anticuerpo policlonal de burro anti-IgG de conejo, Alexa Fluor® 488 (#A-21206, Invitrogen) o con anticuerpo policlonal de burro anti-IgG de ratón, Alexa Fluor® 555 (#A-31570, Invitrogen), ambos Thermo Fisher Scientific. Finalmente, fueron incubadas con DAPI 1:10000 y montadas sobre portaobjetos con el medio de montaje Fluoromount

(Sigma Aldrich). Las fotografías fueron obtenidas en el microscopio confocal LSM 510 Meta (Zeiss LSM Image Browser) o en el microscopio Olympus CKX41.

2.8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La regulación epigenética sobre el promotor P1 de *RUNX2* en WJ-MSC fue evaluada por ensayos de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*), de acuerdo al protocolo validado en el Laboratorio de Regulación Génica (Sepúlveda H y col., 2016). En breve, las WJ-MSC fueron cultivadas en placas de 100 mm a una densidad aproximada de 10.000 células por cm² y las muestras fueron colectadas a los días 0, 2, 4, 8, 15 y 21 de diferenciación osteoblástica. En principio fueron lavadas 2 veces con PBS 1X frío, luego fueron incubadas por 10 minutos en PFA 1% con agitación moderada y a temperatura ambiente, para detener el entrecruzamiento se empleó 1/10 del volumen de PFA 1% de una solución de glicina a concentración final de 125 mM. Fueron mantenidas en agitación por 5 minutos más, posteriormente fueron lavadas con PBS 1X y, utilizando un *cell scraper* plástico, las muestras fueron colectadas con una solución de PBS 1X con inhibidores de proteasas al 1%. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 1800 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet seco fue congelado a -80°C. Al retomar el procesamiento de las muestras, el pellet fue resuspendido en buffer de lisis (Tabla 5) por pipeteo suave e incubado en hielo por 10 minutos. Haciendo uso de pistilos plásticos estériles, las muestras fueron homogenizadas mediante 15 a 20 movimientos. Luego de centrifugar las muestras por 5 minutos a 3000 rpm, el pellet fue resuspendido en 500 µl de buffer de sonicación (Tabla 5) en tubos de sonicación. Para obtener fragmentos de cromatina entre 200 y 500 pb, las muestras fueron sonicadas en agua en el equipo Sonicator Bioruptor (Diagenode Inc., NJ) a potencia media en 4 pulsos de 10 minutos cada uno, con intervalos de ON/OFF de 30 segundos. Posteriormente, fueron centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 12000 rpm, de donde el sobrenadante fue

conservado en tubos Eppendorf nuevos. Antes de congelar a -80°C , se apartaron alícuotas para confirmar el tamaño de la cromatina por electroforesis en geles de agarosa y para cuantificar la concentración de ADN por absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro.

Tabla 5. Composición de buffers para ChIP.

Nombre	Componentes
Buffer de lisis	HEPES pH 8,0 5 mM, KCl 85 mM, Triton X-100 1%, cocktail inhibidor de proteasas 1%
Buffer de sonicación	HEPES pH 7,9 50 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, ácido desoxicólico 0,1%, SDS 0,1%, cocktail inhibidor de proteasas 1%
Buffer LiCl	Tris-HCl pH 8,0 100 mM, LiCl 500 mM, Nonidet P40 0,1%, ácido desoxicólico 0,1%
Buffer TE	2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0
Buffer de elusión	NaHCO_3 50 mM, SDS 1%

Un volumen equivalente a 25 μg de muestra fue aforado hasta 500 μl con buffer de sonicación, para luego ser incubadas con 2 a 4 μg de IgG normal y 50 μl de beads de agarosa recubiertos en proteína A/G (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a 4°C en agitación. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante fue inmunoprecipitado con anticuerpos específicos para las proteínas de interés (Tabla 6), en reacciones individuales por 12 horas a 4°C . Se adicionaron 50 μl de beads de agarosa recubiertos en proteína A (sc-2001) o G (sc-2002, ambos Santa Cruz Biotechnology).

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en ensayos de ChIP

Molécula blanco	Proveedor y número de catálogo
H3	Abcam, ab1791
H3K4me3	Abcam, ab8580
H3K27Ac	Abcam, ab4729
IgG normal	Millipore, 12-370
JARID1B	Cell Signaling, 3273
JARID1C	Abcam, ab34718

Posteriormente las muestras fueron incubadas por 1 hora a 4°C en agitación, lavadas una vez con buffer de sonicación, dos veces con buffer LiCl (Tabla 5) y una vez con buffer Tris-EDTA 1X (Tabla 5), cada lavado por 5 minutos a 4°C. Luego fueron centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm para recuperar los complejos de ADN-proteína con 100 µl de buffer de elusión (Tabla 5) e incubados por 15 minutos a 65°C. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante fue incubado durante la noche a 65°C para revertir el entre-cruzamiento. Al día siguiente, las muestras fueron incubadas con 100 µg/ml de proteinasa K por 2 horas a 50°C para luego aislar el ADN por extracción fenol-cloroformo y precipitación con 0.1 volúmenes de acetato de sodio y 1 µl (20 µg) de glicógeno en 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Luego de centrifugar por 25 minutos a 4°C a 12.500 rpm, el pellet fue lavado con etanol 70% y centrifugado nuevamente por 10 minutos en las mismas condiciones. El pellet fue resuspendido en buffer TE o agua libre de nucleasas. Para el análisis por qPCR (Tabla 7), se utilizaron 5 µl de muestra y 1 µl de inputs.

Tabla 7. Partidores utilizados en ChIP.

Gen y región de ADN	Secuencia
<i>GAPDH</i> (-191/-125)	Fw: CGG GAT TGT CTG CCC TAA T Rv: GCA CGG AAG GTC ACG ATG T
<i>RUNX2-P57</i> (-171/+10)	Fw: GTG GTA GGC AGT CCC ACT TTA Rv: AGA AAG TTT GCA CCG CAC TTG

Los genes fueron analizados en las condiciones mencionadas anteriormente (Tabla 3).

2.9. Mineralización

2.9.1. Tinción con Alizarin Red S

Las WJ-MSC fueron lavadas con PBS 1X a temperatura ambiente y fijadas con una solución de etanol y formaldehído 37% en proporción 9:1 por 30 segundos. Nuevamente fueron lavadas con PBS 1X para remover la solución de fijación y luego fueron incubadas en 40 mM Alizarin Red S (Sigma Aldrich) pH 4,2 por 1 hora con agitación moderada y en

ausencia de luz. La tinción fue removida con agua bidestilada y 2 lavados de 5 minutos con PBS 1X.

a. Los resultados de la tinción fueron registrados fotográficamente con el software UVITEC Alliance 9.7 en máxima resolución y analizados con ImageJ para la cuantificación de intensidad integrada según los pixeles de cada imagen.

b. Posteriormente, el PBS 1X fue eliminado y se agregaron 400 µl de ácido acético 10% por pocillo de 10 cm², de modo de cubrir toda la monocapa de WJ-MS. Fueron incubadas en agitación por 30 minutos, luego de lo cual fueron raspadas suavemente con un *cell scraper* estéril y transferidas a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Luego de un vórtex de 30 segundos, fueron incubadas por 10 minutos a 85°C y transferidas inmediatamente después a un contenedor con hielo por 5 minutos. Una vez enfriadas, fueron centrifugadas por 15 minutos a 13500 rpm, de donde fueron colectados 200 µl de sobrenadante y transferidos a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. El pH de cada muestra fue ajustado con aproximadamente hidróxido de amonio 10% hasta alcanzar un valor entre 4,1-4,5. Una alícuota de 50 µl por muestra, en duplicado, fue cargada por pocillo de una placa de 96 pocillos. Además, fueron agregados los puntos de la curva estándar, también en duplicado. La absorbancia a 405 nm fue registrada en el lector de placas Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant, de tal manera de obtener la concentración de Alizarin Red S en cada muestra.

2.9.2. Ensayo de actividad fosfatasa alcalina

Las células fueron lavadas con PBS 1X, fijadas por 30 segundos con una solución de etanol y formaldehído 37% (9:1), lavadas con agua bidestilada e incubadas con BCIP 3,5 µl/ml y NBT 4,5 µl/ml en 1-2 ml de Buffer de Reacción ALP (NaCl 100 mM, MgCl₂ 50mM, Tris pH 9,5 100 mM) durante la noche en oscuridad. Al terminar fueron lavadas

con agua bidestilada y PBS 1X y el resultado fue observado y registrado en el microscopio óptico CKX41 (Olympus).

2.9.3. Cuantificación de calcio

Para medir la concentración relativa de calcio en la fase terminal de la diferenciación osteoblástica se empleó el método colorimétrico basado en la formación del complejo cromogénico entre iones calcio y *o*-cresoltaleína, según las instrucciones del fabricante (K380-250, BioVision). Brevemente, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas en ausencia de luz con agitación suave y a temperatura ambiente en 1 ml de HCl 1 N por 24 hrs. La concentración de calcio extracelular fue evaluada en el sobrenadante según el valor de absorbancia a 575 nm, con respecto a los valores de la curva estándar, en el equipo Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant microplate reader.

2.10. Análisis estadístico

Todos los ensayos cuantitativos cuentan con al menos 3 réplicas biológicas, es decir, fueron realizados en al menos 3 cultivos independientes de WJ-MSC, previamente generados en el laboratorio: WJ17T, WJ37T, WJ40T, WJ42T, WJ49T, WJ58T, WJ59T, WJ68T, WJ78T, WJ80T, WJ84T, WJ86T, WJ87T, WJ88T, WJ90T, WJ122T, WJ110; y analizados en duplicado. La significancia estadística de los resultados fue evaluada según los valores promedio, con su respectiva desviación estándar, por ANOVA de dos vías con $p < 0,05$ y graficados en el programa GraphPad Prism 6.

3. RESULTADOS

Caracterización del potencial osteoblástico de WJ-MSC

Frente a estudios epigenéticos recientes en WJ-MSC, en relación a su limitado potencial de diferenciación osteoblástica (Sepúlveda H y col., 2016), evidenciado por la baja concentración de marcas asociadas a una activa transcripción génica en la región promotora del gen maestro de la osteoblastogénesis *RUNX2*, se indagó primero en la expresión de *RUNX2-P57* y de su represor epigenético *JARID1B* por qPCR, en cultivos primarios de WJ-MSC inducidas a diferenciación mediante el cultivo en medio osteoblástico (OM), con el propósito de caracterizar el perfil de expresión génica y proteica asociados a la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC. La expresión de *RUNX2-P57* en el tiempo muestra un valor máximo al día 4 en OM, y posterior al día 8, se estabiliza en un nivel de expresión significativamente menor (Fig. 11). Por el contrario, en CM la expresión de *RUNX2-P57* se mantiene uniforme a lo largo de 21 días en cultivo. El nivel de ARNm de *JARID1B* no varía significativamente en el tiempo, ya sea en CM o en OM (Fig. 11)

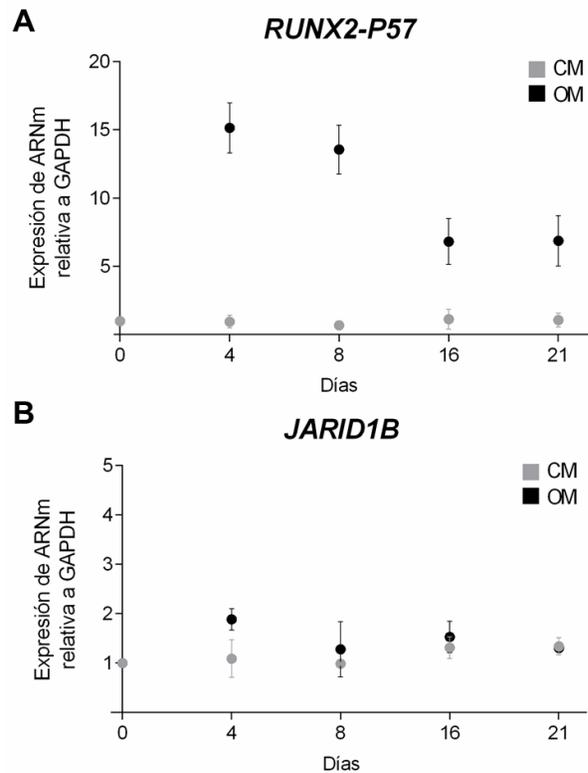


Figura 11. Expresión de ARNm relativa a *GAPDH* de los genes *RUNX2-P57* y *JARID1B* en WJ-MSC en función del tiempo de cultivo. Tres cultivos diferentes de WJ-MSC fueron mantenidos por 21 días en CM y OM, de donde fueron colectadas muestras en TRIZOL los días 4, 8, 16 y 21. Además, se incluyó un punto correspondiente a 24 hrs de cultivo en CM como normalizador ($x=0, y=1$). Las muestras fueron analizadas por qPCR con los partidores de *RUNX2-P57*, *JARID1B* y *GAPDH*, con lo cual fue calculada la expresión transcripcional específica para los genes *RUNX2-P57* (A) y *JARID1B* (B). La concentración relativa de transcrito ARNm de *RUNX2-P57* más alta se observa a 4 días de cultivo en OM, mientras que para *JARID1B* no se distingue un máximo definido, independiente del medio de cultivo.

Posteriormente, fue evaluada la expresión proteica de RUNX2 y JARID1B, mediante el análisis por Western Blot de extractos nucleares de muestras de WJ-MSC en CM y OM a días 4, 8, 15 y 21 (Fig. 12). En WJ-MSC inducidas a diferenciación osteoblástica, se obtuvo un máximo en la concentración de RUNX2 al día 4. En tanto, al analizar JARID1B se observó una expresión uniforme, sin cambios significativos con respecto al tiempo o medio de cultivo. Los resultados coinciden con la tendencia observada por qPCR sobre

la concentración de transcritos de ARNm de los genes respectivos (Fig. 11). Fue confirmado que estas células expresan la proteína JARID1B mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), cuya marca GFP (verde) co-localiza con el núcleo celular de WJ-MSC marcado con DAPI (azul) (Fig. 12C).

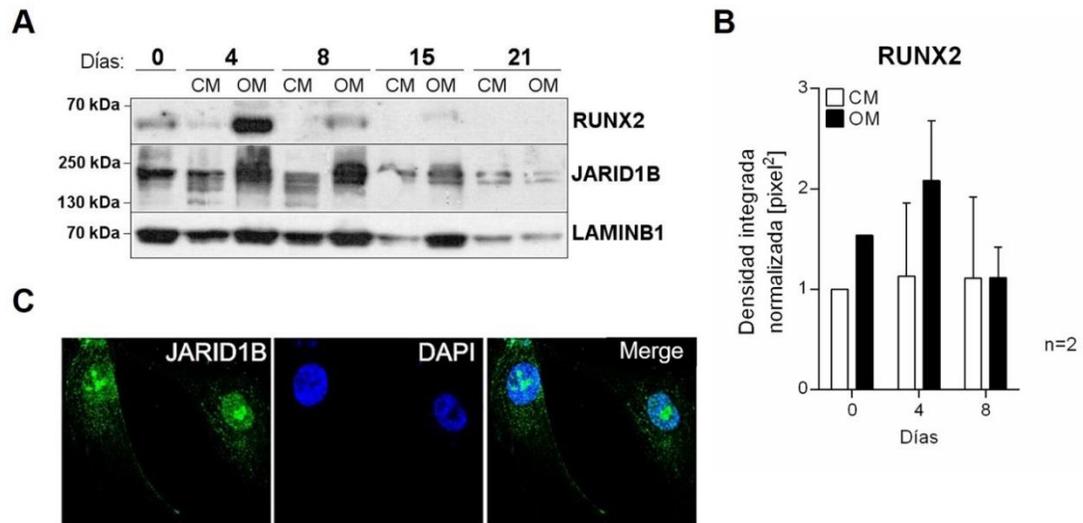


Figura 12. Western Blot de RUNX2 y JARID1B en extractos nucleares de WJ-MSC en días 0, 4, 8, 15 y 21. La expresión proteica de RUNX2 y JARID1B en función del tiempo fue evaluada por Western Blot a partir de muestras obtenidas por aislamiento de la fracción nuclear desde cultivos en CM y OM para los días 0, 4, 8, 15 y 21. Como control de carga se utilizó LAMIN B1, un marcador de la envoltura nuclear. En concordancia con el análisis transcripcional por qPCR, se observó un máximo de expresión proteica de RUNX2 al día 4 en OM y un patrón de expresión sostenida de JARID1B hasta el día 21, sin diferencias significativas entre CM y OM en un mismo día. Resultados generados en colaboración con el Dr. Francisco Bustos (A). El análisis cuantitativo por densitometría de dos resultados independientes en días 0, 4 y 8 deja en evidencia que existe una tendencia hacia una expresión máxima de RUNX2 en OM al día 4. Los valores fueron normalizados por LAMIN B1 y cada resultado está expresado como promedio \pm desviación estándar (B). La expresión y localización subcelular de la demetilasa de histonas JARID1B fue confirmada por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en WJ-MSC. JARID1B marcado con GFP co-localiza con el núcleo celular (DAPI). Resultado generado por José Palma (C).

ALP es un marcador de células pre-osteoblásticas, por lo cual su actividad fue evaluada en WJ-MSC y en células Saos-2, que corresponde a una línea celular de osteosarcoma primario (ATCC® HTB-85™). Luego de 8 días de cultivo en CM y OM, el revelado

muestra a las células con actividad enzimática positiva teñidas de color azul oscuro (Fig. 13A). La línea celular Saos-2 presenta un alto nivel de actividad enzimática de ALP en CM y OM, en contraste con el cultivo de WJ-MSC en donde, sólo en OM, una proporción menor de células expresan actividad ALP positiva. Este resultado es consistente con lo reportado en Sepúlveda H y col., 2016. Sin embargo, en cultivos de WJ-MSC mantenidos en OM por 21 días, la concentración de sales de calcio es aproximadamente 3 veces mayor a la que se cuantifica en WJ-MSC que no fueron inducidas a diferenciación osteoblástica (Fig. 13B).

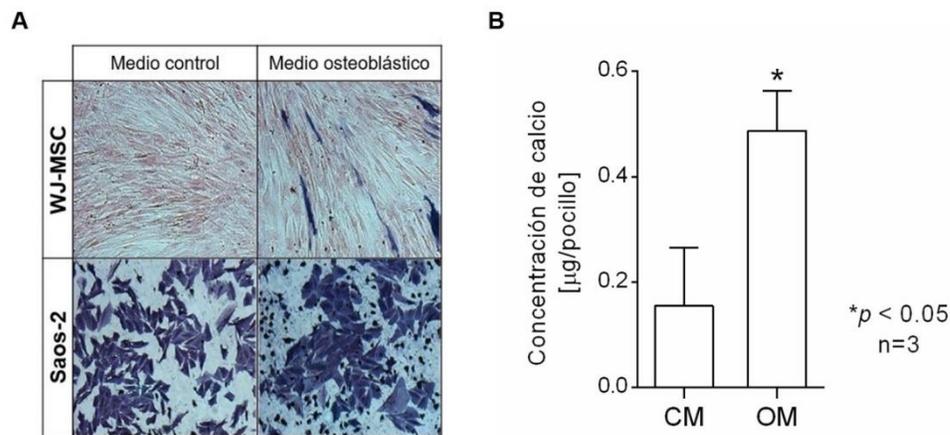


Figura 13. Mineralización en WJ-MSC inducidas a diferenciación osteoblástica: actividad fosfatasa alcalina y deposición de sales de calcio. Una fracción menor del total de WJ-MSC observadas en el campo del microscopio óptico (aumento 4X), revelan actividad ALP positiva al ser cultivadas en OM por 8 días. En CM no se detecta actividad enzimática de ALP (A: panel superior). En cambio, en la línea celular de osteosarcoma Saos-2 (A: panel inferior), se observa actividad ALP en prácticamente la totalidad de las células cultivadas, en CM y OM. (B) La deposición de sales de calcio a los 21 días de cultivo en CM y OM fue cuantificada mediante un kit colorimétrico, obteniendo un aumento significativo en WJ-MSC mantenidas en OM, con respecto a CM. La concentración de calcio en el sobrenadante de WJ-MSC cultivadas en OM es aproximadamente 3 veces mayor a la obtenida desde cultivos de WJ-MSC en CM.

Unión de JARID1B al promotor P1 de *RUNX2-P57* en WJ-MSC

La expresión génica asociada a diferenciación osteoblástica en MSC es regulada tanto a nivel genético, como epigenético. JARID1B es un regulador epigenético negativo de la

expresión de *RUNX2* durante la diferenciación osteoblástica (Rojas A y col., 2015), por lo cual su unión al promotor P1 en WJ-MSC fue estudiada mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Así mismo, fueron evaluados los cambios en el patrón de marcas epigenéticas previamente descritas en el promotor P1 de *RUNX2*. Este trabajo fue ejecutado en el Laboratorio de Regulación Génica (UNAB), en conjunto con el Dr. Hugo Sepúlveda. Las WJ-MSC fueron cultivadas por un total de 21 días en CM y OM. En el promotor P1 de *RUNX2* se observó un enriquecimiento significativo de JARID1B al día 2 en OM, relativo al estado basal en día 0 (Fig. 14A), concordante con la máxima señal observada para las marcas activadoras de la transcripción génica, H3K4me3 y H3K27Ac (Fig. 14B y C). En el promotor del gen *housekeeping GAPDH*, no se observaron estas variaciones epigenéticas (Fig. 14). Es interesante tener en cuenta que el nivel transcripcional de JARID1B se mantiene prácticamente uniforme a lo largo de la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC (Fig. 11).

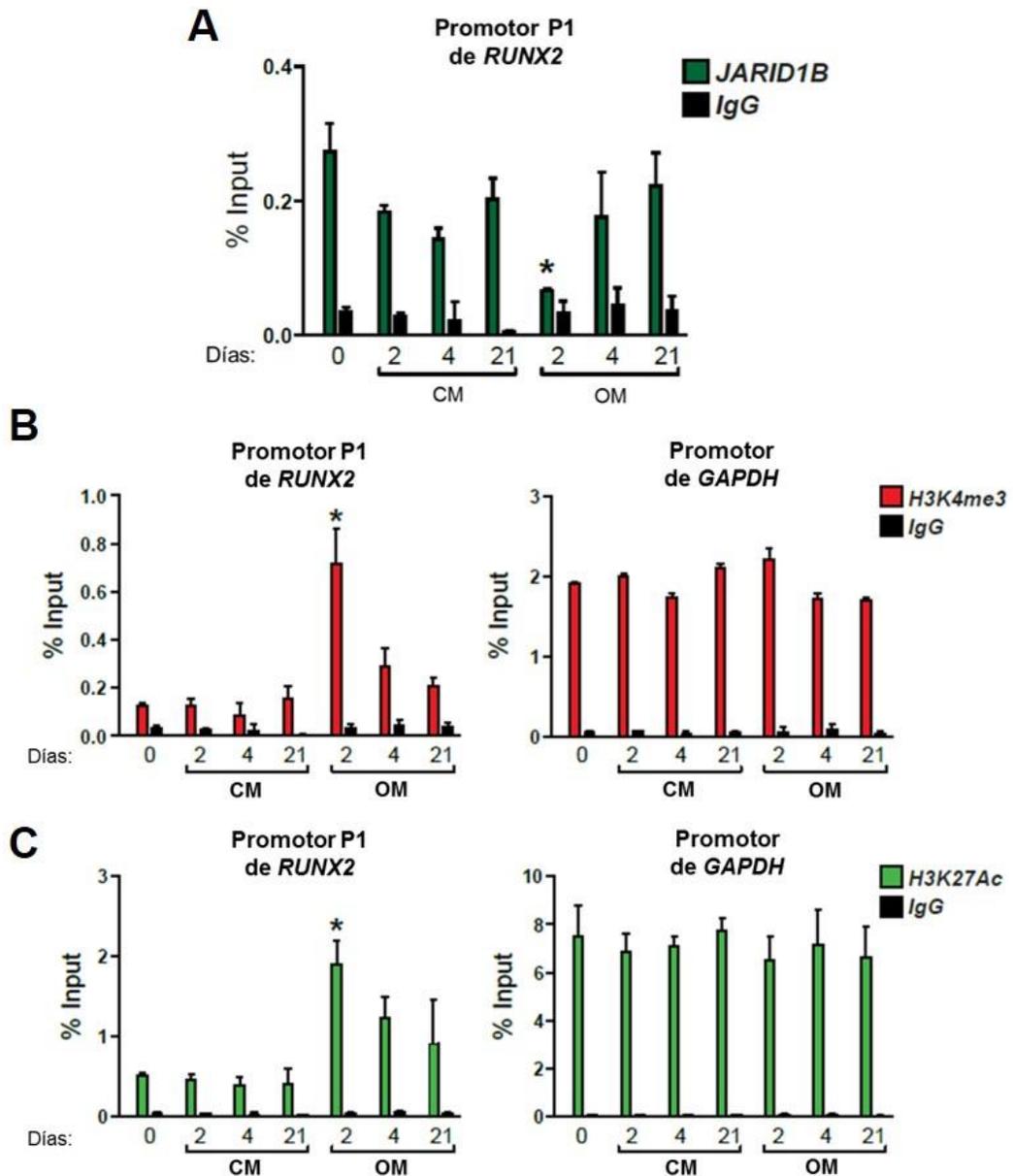


Figura 14. Cambios epigenéticos en el promotor P1 de *RUNX2* asociados a diferenciación osteoblástica en WJ-MSC. (A) Se observa un máximo de unión del represor epigenético JARID1B al promotor P1 en día 2 en WJ-MSC inducidas a diferenciación osteoblástica con OM. De forma similar, se observa un enriquecimiento significativo de las marcas epigenéticas H3K4me3 (B) y H3K27Ac (C), al día 2 de cultivo en OM. Por el contrario, y en concordancia a lo descrito en Sepúlveda H y col., 2016, en WJ-MSC mantenidas en CM no se observan estos cambios en JARID1B, H3K4me3 y H3K27Ac, como tampoco en el promotor del gen *housekeeping GAPDH*. Los resultados están expresados como promedio \pm error estándar, analizados por t de Student con $*p < 0,05$. Figura original adaptada desde Bustos F y col., 2017 (manuscrito en revisión).

Efecto de PBIT sobre la expresión de genes osteoblásticos

Con el objetivo de potenciar la expresión del gen maestro de la osteoblastogénesis, *RUNX2*, mediante el uso de un inhibidor farmacológico que actúa sobre el represor epigenético JARID1B, fue necesario establecer un protocolo de tratamiento *in vitro*, de tal manera de ser efectivo e inocuo para las células, y reproducible en cualquier cultivo primario de WJ-MSC. Para ello, las WJ-MSC fueron tratadas con PBIT 1, 3, 10 y 30 μM (en DMSO) en dosis única, y mantenidas en CM u OM por 48 horas (Fig. 9). Las concentraciones de 10 y 30 μM resultaron tóxicas para las células, mientras que en cultivos tratados con PBIT 3 μM se observó menor grado de muerte celular. La condición control, a la cual se agregó un volumen equivalente del vehículo DMSO, y el tratamiento con PBIT 1 μM , no afectaron la sobrevivencia ni la integridad de las células (Fig. 15A). Esto fue observado en el microscopio óptico de luz mediante el ensayo de viabilidad celular con azul de tripán. En base a lo anterior, fue evaluada la expresión de *RUNX2-P57* en WJ-MSC tratadas con PBIT 1 y 3 μM , con respecto a la situación control (DMSO), obteniendo una diferencia significativa entre CM y OM a concentración de PBIT 1 μM (Fig. 15B). Una vez establecido el protocolo definitivo de ensayos cortos, que consiste en emplear PBIT 1 μM en dosis única, el efecto del inhibidor farmacológico sobre la expresión de la isoforma *RUNX2-P57* fue ratificado en otros dos cultivos de WJ-MSC (n=5), obteniendo una diferencia significativa al comparar CM y OM (Fig. 15C). Con ello, es posible afirmar que existe un efecto sinérgico entre la actividad del fármaco y la capacidad inductora del medio de diferenciación osteoblástica en WJ-MSC.

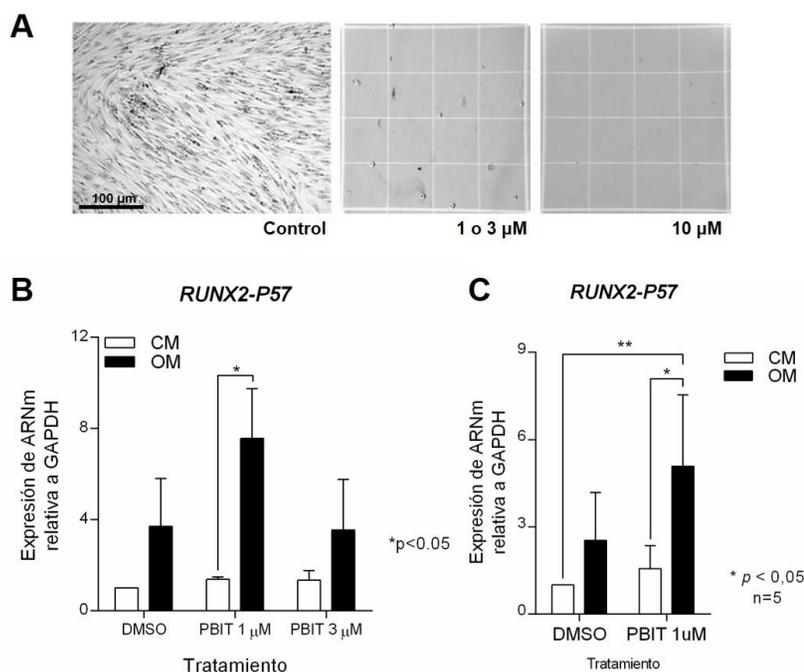


Figura 15. Determinación de la dosis y concentración óptimas de PBIT en WJ-MSC en ensayos de diferenciación osteoblástica a corto plazo (48 hrs). En comparación con la condición control (vehículo, DMSO), las concentraciones de PBIT 10 y 30 μM provocaron la muerte del 100% de las células sembradas inicialmente (100.000 WJ-MSC), mientras que en PBIT 1 y 3 μM , no se observaron niveles elevados de muerte o toxicidad celular. La fotografía de la condición control es representativa del cultivo de WJ-MSC en CM, en donde el crecimiento celular no se ve afectado, tampoco la integridad de las células. Las imágenes de 1 o 3 y 10 μM son también representativas y corresponden al registro fotográfico del ensayo de viabilidad celular con azul de tripán en cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico de luz en aumento 4X. En ellas se observa el efecto tóxico de PBIT 10 μM , en comparación a la inocuidad de los tratamientos con PBIT 1 y 3 μM (A). Los cultivos tratados con PBIT 1 y 3 μM (n=3 para cada condición, incluyendo el control respectivo) fueron posteriormente evaluados con respecto a la expresión relativa de *RUNX2-P57*, obteniendo un aumento significativo en WJ-MSC tratadas con PBIT 1 μM al comparar OM versus CM (*p < 0,05) (B). Posteriormente, la metodología fue confirmada con un total de 5 cultivos de WJ-MSC en CM y OM, obteniendo que la expresión de *RUNX2-P57* aumenta significativamente frente al tratamiento farmacológico en OM con respecto al uso del vehículo DMSO en OM y al cultivo en CM (C).

En ensayos de diferenciación osteoblástica con inhibición farmacológica a largo plazo, los análisis de qPCR fueron limitados hasta el día 8. Esto porque en ensayos preliminares se observó un comportamiento errático de *GAPDH* en etapas tardías (sobre día 8) de la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC tratadas con PBIT, lo cual fue

confirmado también para los genes *housekeeping* murinos, *RPL29* (Fig. 16) y *RPL13a*. Dada esta situación, dichos genes no pueden ser empleados como calibrador en el análisis por qPCR, ya que arrojarían resultados imposibles de interpretar y comparar.

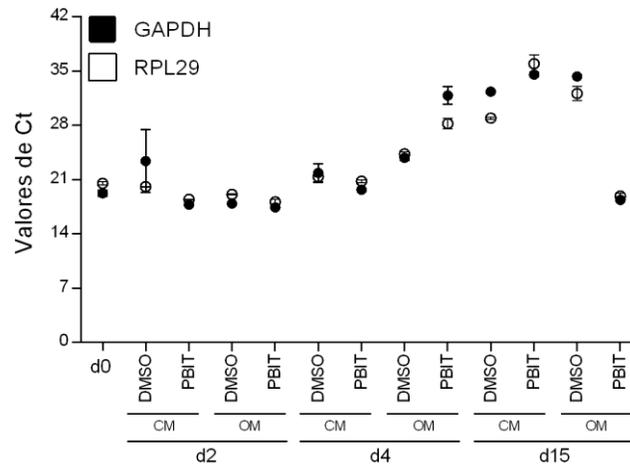


Figura 16. Los genes *housekeeping* *hGAPDH* y *rRPL29* no se comportan como tal en etapas avanzadas de la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC en tratamiento con PBIT 1 μ M. Los valores de Ct para los genes *hGAPDH* y *rRPL29* no se mantienen uniformes a partir del día 15 de la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC. Dado que su comportamiento no se ajusta al esperado de un gen *housekeeping*, y por ende no es útil como calibrador en análisis por qPCR, los días posteriores al día 8 de diferenciación osteoblástica no fueron evaluados.

Se obtuvieron muestras de los puntos NT, d0, d1, d3, d5 y d9 (Fig. 10) para el análisis por qPCR. Sin embargo, la extracción desde TRIzol resultó en ARN con bajos indicadores de pureza: en promedio, la razón entre la absorbancia a 260 nm con respecto a 280 nm fue de $1,56 \pm 0,12$. Acorde a las instrucciones de uso del reactivo (Rio D y col., 2010), con un valor aproximado de 2 el ARN se considera puro, mientras que valores menores son indicativo de una alta concentración de contaminantes, especialmente proteínas. Al visualizar los resultados de la extracción de ARN por electroforesis en gel de agarosa, se observó que en algunas muestras no existía una cantidad suficiente para ser detectada mediante este método, razón por la cual no fue posible proceder al análisis por qPCR de los genes propuestos.

Efecto de PBIT en el estado epigenético de WJ-MSC

Como PBIT es un inhibidor del represor epigenético de *RUNX2*, JARID1B, que remueve grupos metilo desde lisina 4 (K4) trimetilada en la histona H3 y, por ende, disminuye la concentración de esta marca epigenética en la cromatina, se procedió a evaluar la variación en el nivel de H3K4me3 en función del tiempo y del tratamiento con PBIT 1 μ M. La expresión relativa de la histona modificada no presenta cambios significativos a lo largo del tiempo, ni tampoco en respuesta al fármaco, con respecto a su vehículo DMSO (Fig. 17A y B). Sin embargo, el análisis por ChIP revela que existe un aumento significativo en la concentración de H3K4me3 en el promotor P1 de *RUNX2* en WJ-MSC en CM y OM, en ensayos con PBIT 1 μ M a corto plazo (equivalente a d3 en el protocolo de tratamiento farmacológico a largo plazo), con respecto al vehículo DMSO (Fig. 17C).

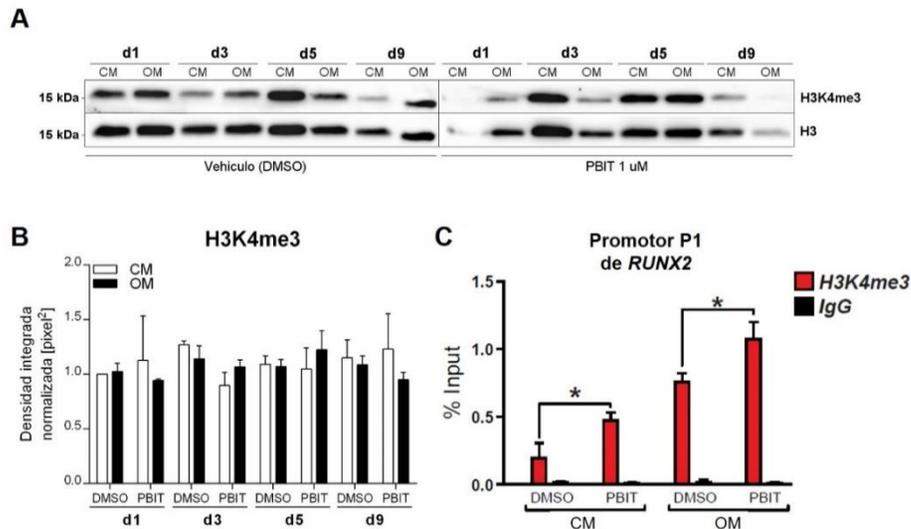


Figura 17. Cambios en la concentración de H3K4me3 durante el tratamiento farmacológico de WJ-MSC con PBIT 1 μ M. El análisis por densitometría del resultado obtenido por Western Blot en (A), señala que no existen diferencias significativas en el nivel de la histona modificada H3K4me3 en función del tiempo, ni tampoco en respuesta al tratamiento con PBIT 1 μ M (B). Sin embargo, los ensayos de ChIP evidencian cambios significativos en la concentración de H3K4me3 en el promotor P1 de *RUNX2*, producto del uso a corto plazo (equivalente a d3) de PBIT 1 μ M en WJ-MSC, con respecto a su vehículo DMSO. El gráfico en (C) corresponde al manuscrito en revisión en *Stem Cells*, Bustos F y col., 2017, donde * $p < 0,05$.

Mineralización en WJ-MSC bajo tratamiento farmacológico

Para evaluar el grado de mineralización por calcificación, relacionado con el potencial osteoblástico, en WJ-MSC en días 14 y 20, fueron realizados ensayos de tinción con Rojo Alizarín (ARS) y cuantificación de calcio por kit colorimétrico. Los resultados de las tinciones con ARS fueron registrados fotográficamente (Fig. 18). La tinción con ARS permite deducir que se produce mayor deposición de sales de calcio en la condición de WJ-MSC tratadas con PBIT 1 μ M en OM, en días 14 y 20. Por otro lado, luego de 20 días es posible notar que algunas de las WJ-MSC mantenidas en CM comienzan a desprenderse de la superficie de la placa, probablemente producto de la elevada confluencia celular alcanzada en este punto. Este fenómeno no se observa en OM, dado que al inducir a WJ-MSC hacia diferenciación osteoblástica, la proliferación celular se ve desfavorecida (Fig. 18B).

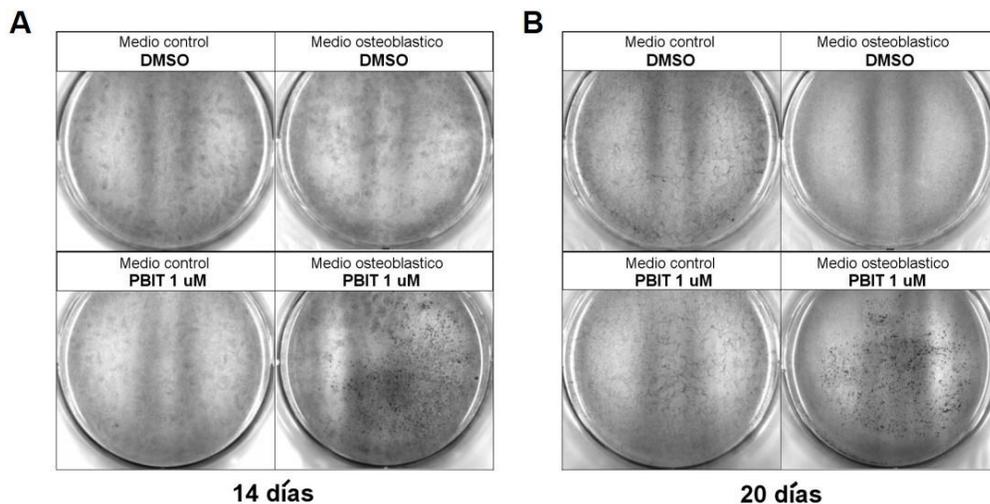


Figura 18. Mineralización terminal en WJ-MSC bajo tratamiento farmacológico, evaluada mediante tinción con Alizarin Red S. Las fotografías son representativas de 3 réplicas de cada condición, en 2 cultivos independientes de WJ-MSC. Fueron registradas en el equipo fotodocumentador UVITEC y cuantificadas en ImageJ según la densidad integrada obtenida a partir de los píxeles de cada imagen. La mayor concentración de sales de calcio se observa en WJ-MSC tratadas con PBIT 1 μ M en OM, tanto en día 14 (A) como en día 20 (B). Estas diferencias cualitativas no se ven representadas en la cuantificación por intensidad de píxeles (datos no mostrados).

Otra forma de evaluar de manera cuantitativa el resultado de la tinción con ARS es mediante espectrofotometría, vale decir, evaluar la concentración relativa de calcio libre en el sobrenadante de WJ-MSC a través de la absorbancia de este. Para ello, primero fue construida una curva de calibración con diluciones conocidas de ARS, preparadas a partir de la solución madre de 40 nM (Fig. 19A). Los valores de concentración de ARS [nM] obtenidos para las muestras de WJ-MSC colectadas en días 14 y 20, fueron en su mayoría negativos, por lo cual fueron graficados los valores de absorbancia neta a 405 nm (Fig. 19B). Esta representación permite notar que, sólo al día 14, el tratamiento con PBIT resulta en un aumento significativo en los depósitos de calcio, determinado mediante la concentración de alizarin red incorporado (Fig. 19B). En día 20 no se obtuvo diferencias significativas (datos no mostrados). Una cuarta aproximación para evaluar la capacidad de mineralización en WJ-MSC bajo tratamiento farmacológico, fue la cuantificación de depósitos de calcio por colorimetría mediante un sistema comercial. La curva de calibración fue confeccionada antes de la medición (Fig. 19C), para posteriormente obtener los valores de concentración de calcio para las muestras, según la absorbancia medida a 575 nm (Fig. 19D). Se obtuvieron diferencias significativas entre CM y OM en días 14 y 20, tanto en el uso de PBIT 1 μ M, como del vehículo DMSO. La magnitud de esta diferencia es considerablemente mayor en día 20, con respecto a día 14 (símbolos en rojo). Por otro lado, el tratamiento con PBIT 1 μ M no representa una variación significativa en la deposición de sales de calcio, en relación al uso de DMSO (símbolos en azul). La comparación de la acumulación de sales de calcio en función de la temporalidad (día 14 versus día 20), evidencia que existen diferencias de magnitud significativa al emplear DMSO, no así PBIT 1 μ M (símbolos en verde).

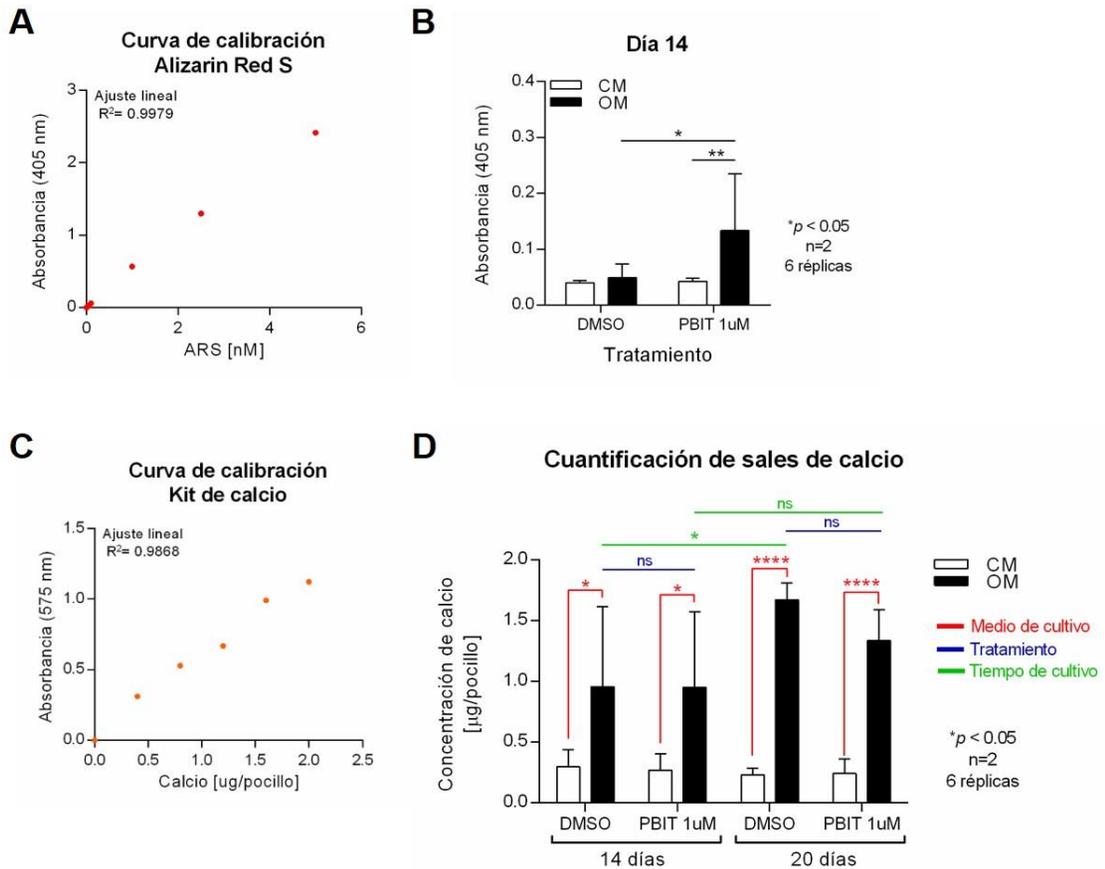


Figura 19. Mineralización en WJ-MSC en tratamiento con PBIT. Los resultados de la tinción con ARS fueron cuantificados en base a la absorbancia a 405 nm del sobrenadante de cada cultivo. Se construyó una curva de calibración a partir de la solución madre de ARS 40 nM (A). Los resultados obtenidos para concentración de ARS en las muestras fueron en su mayoría negativos, por lo cual el resultado fue presentado como absorbancia neta de las 6 réplicas de cada condición (B), lo que permite observar que existen diferencias significativas entre DMSO y PBIT 1 μ M en OM luego de 14 días de cultivo ($*p < 0,05$). Se utilizó un kit colorimétrico comercial (K380-250, BioVision) para cuantificar la deposición de sales de calcio en WJ-MSC, para lo cual primero fue construida una curva de calibración (C). Se observan diferencias significativas entre CM y OM (código de color: rojo) en todas las condiciones, particularmente en día 20, donde la magnitud de esta diferencia es mayor. El tratamiento con PBIT 1 μ M, con respecto a su control DMSO (código de color: azul), no representa una diferencia significativa en el aumento en la calcificación en WJ-MSC. En día 20, la acumulación de sales de calcio en DMSO es significativamente mayor que a día 14, y no ocurre lo mismo con PBIT 1 μ M (código de color: verde).

Silenciamiento de JARID1B en WJ-MSC

Habiendo ensayado el aumento de la expresión de *RUNX2* en WJ-MSC de manera directa a través de la sobreexpresión lentiviral de *mRunx2*, y de manera indirecta mediante el uso del fármaco PBIT, que reduce la actividad del represor epigenético JARID1B, se propuso abordar la expresión de esta proteína con vectores virales de naturaleza *short hairpin RNA* para abolir su actividad transcripcional. En efecto, el virus shJARID1B reduce significativamente la expresión de la proteína JARID1B (Fig. 20A) y la síntesis de transcritos *JARID1B* (Fig. 20B). Así, en OM la expresión relativa de *RUNX2-P57* aumenta significativamente en relación al virus control (shCtrl). También en OM, la transducción de WJ-MSC con virus shJARID1B resultó en un enriquecimiento significativo de la concentración de las marcas epigenéticas activadoras, H3K4me3 (Fig. 20C) y H3K27Ac (Fig. 20D), en el promotor P1 de *RUNX2*, a diferencia de lo obtenido en CM, en donde el nivel de ambas se mantiene constante.

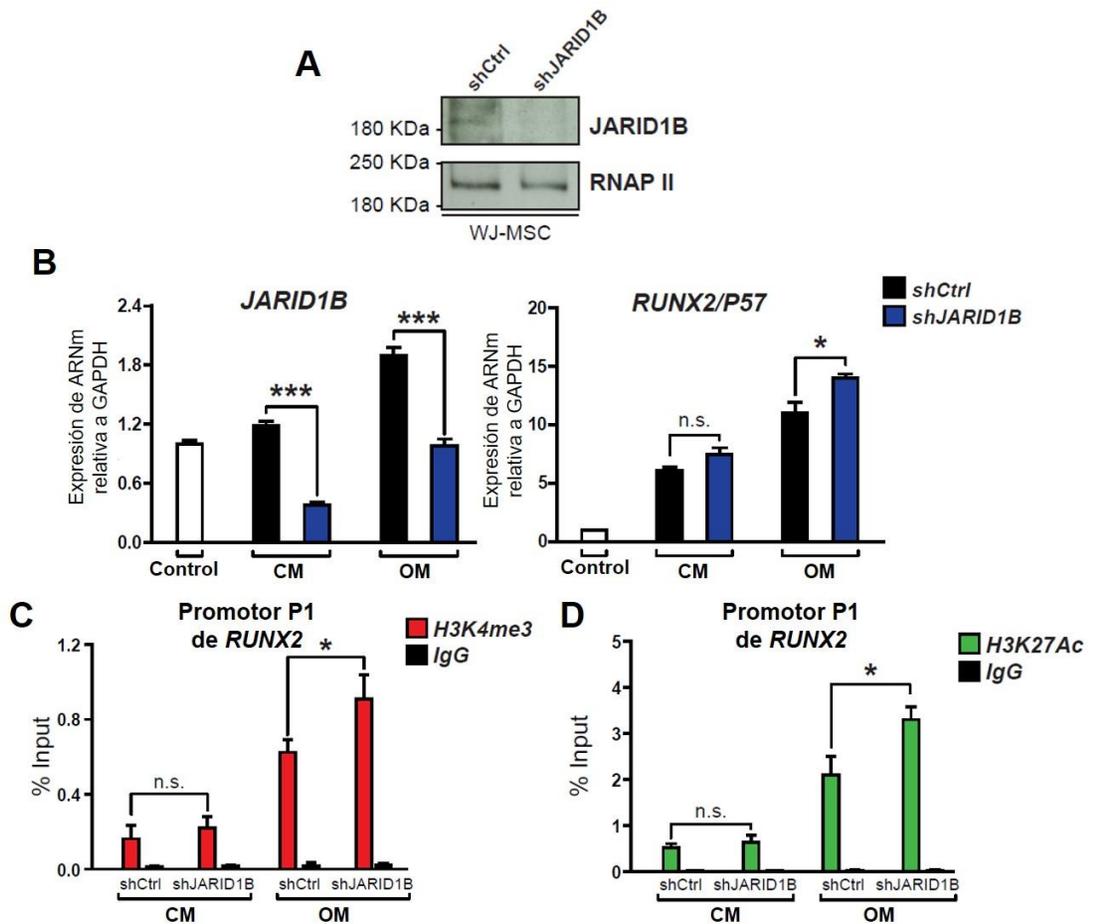


Figura 20. Silenciamiento de JARID1B en WJ-MSC. El virus shJARID1B es efectivo en la reducción de la expresión de la proteína JARID1B (A), como se muestra en un Western Blot representativo, con ARN polimerasa II como control de carga para shJARID1B y su control shCtrl. Es además efectivo en el silenciamiento de transcritos *JARID1B* (B) en WJ-MSC, tanto en CM como en OM. La expresión de *RUNX2-P57* aumenta significativamente en WJ-MSC transducidas con virus shJARID1B e inducidas a diferenciación osteoblástica, con respecto al uso de shCtrl y al cultivo en CM. El nivel de expresión basal de *JARID1B* y *RUNX2-P57* se muestra en (B) como “Control” en barras de color blanco, que representan WJ-MSC que no fueron transducidas con vectores virales. A través del análisis por CHIP del promotor P1 de *RUNX2*, se observa un enriquecimiento significativo de las marcas epigenéticas H3K4me3 (C) y H3K27Ac (D), relacionadas con eventos de activación transcripcional, en células transducidas con virus shJARID1B e inducidas a diferenciación osteoblástica, en relación al uso del vector shCtrl y al cultivo en CM. Los resultados de CHIP están expresados como promedio \pm error estándar, y analizados por t de Student con $*p < 0,05$. Estos resultados fueron generados en colaboración con el Dr. Hugo Sepúlveda y las figuras fueron adaptadas desde Bustos F y col., 2017 (manuscrito en revisión en la revista *Stem Cells*).

Resultados no experimentales: Logros formativos

En el marco del proyecto FONDEF D09E1047 de la directora Dra. Verónica Palma, parte de los resultados del presente seminario de título fueron presentados en modalidad de póster en el XXX Congreso Anual de la Sociedad Chilena de Biología Celular en noviembre del año 2016. Además, en el contexto de la colaboración con el Laboratorio de Regulación Génica del Dr. Martín Montecino, se incorporó parte del trabajo aquí expuesto en un manuscrito enviado a la revista *Stem Cells* (Bustos F y col., 2017), que se encuentra actualmente en revisión.

4. DISCUSIÓN

El inevitable envejecimiento poblacional es uno de los principales responsables del aumento en la prevalencia de patologías óseas y en la frecuencia de fracturas de hueso, que deben ser atendidas en el sistema de salud (Ahmad W y col., 2015). Los injertos óseos son actualmente la alternativa más empleada en el tratamiento de fracturas severas y pérdidas de hueso. Sin embargo, esta es una estrategia que posee importantes limitantes: el riesgo de incompatibilidad inmune, la baja disponibilidad de tejido sustituto y los peligros propios de una intervención quirúrgica (Oryan A y col., 2014). Frente a esta situación, la ingeniería de tejidos óseos en combinación con la terapia celular basada en MSC, surge como una solución atractiva y conveniente para tratamientos clínicos desde la perspectiva de la medicina regenerativa.

Las WJ-MSC son candidatas ideales para aplicaciones biomédicas, sin embargo, poseen un potencial osteoblástico restringido. Lo anterior se explica, en parte, por el estado epigenético del promotor P1 de *RUNX2*, caracterizado por bajos niveles de modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a una activa transcripción génica (H3K4me3, H3K27Ac), actuando como una “barrera epigenética” para el compromiso a linaje óseo. Resulta importante, entonces, ahondar en los mecanismos que regulan el proceso de osteoblastogénesis y modularlo de tal manera de aumentar el potencial osteoblástico, y así contribuir al uso efectivo de WJ-MSC en ingeniería de tejidos óseos.

Incremento del potencial osteoblástico de cultivos primarios de WJ-MSC mediado por la pérdida de función de JARID1B

Habiéndose demostrado la efectividad de la sobreexpresión de *RUNX2* en MSC adultas en el incremento significativo del potencial de diferenciación ósea y formación de hueso maduro (Zhang X y col., 2006; Lee S y col., 2010; Lee J y col., 2011), se ensayó en primera instancia la sobreexpresión de *Runx2* exógeno en WJ-MSC por transducción lentiviral. Se obtuvo un aumento significativo de la expresión de *SP7*, *ALP* y *BSP*, y no de *BGLAP* y *COL1A1* (Fig. 5). Este resultado ratifica el carácter de regulador clave de *RUNX2* en la activación de la expresión génica asociada a diferenciación osteoblástica y aporta al argumento de una resistencia intrínseca de las WJ-MSC al compromiso a linaje óseo. Bajo este razonamiento y con los antecedentes de estudios epigenéticos (Rojas A y col., 2015; Sepúlveda H y col., 2016), se propuso modular la diferenciación osteoblástica en WJ-MSC aumentando la expresión de *RUNX2-P57* al destrabar la “barrera epigenética” mencionada anteriormente, y que es mediada por *JARID1B*. Con el objetivo de disminuir la represión transcripcional de *RUNX2-P57*, se indagó en la reducción de la actividad enzimática de *JARID1B* a través del inhibidor farmacológico PBIT y en el silenciamiento de su expresión génica mediante lentivirus. Se logró establecer que existe un efecto sinérgico entre la actividad del fármaco y la capacidad inductora del medio de diferenciación osteoblástica, en relación a la inducción de la expresión del gen maestro *RUNX2-P57*. Vale decir, PBIT ejerce su acción inhibitoria de manera eficaz sólo en WJ-MSC en que se dio inicio al programa de diferenciación osteoblástica, que involucra cambios en el perfil de expresión génica, particularmente la activación transcripcional de *RUNX2*. En ensayos cortos, PBIT 1 μ M en dosis única es capaz de aumentar significativamente la expresión de *RUNX2-P57*, y se presume que

se debe a la inhibición de la actividad represora de JARID1B. En efecto, la adición de PBIT 1 μ M al medio de cultivo resulta en un enriquecimiento significativo de la marca epigenética H3K4me3 en el promotor P1 de *RUNX2* (Fig. 16C), lo cual se explicaría por una menor actividad demetilasa de JARID1B.

En ensayos largos, PBIT fue agregado a la misma concentración sólo hasta el día 4 de diferenciación osteoblástica, ya que la sobreexpresión prolongada de *RUNX2* inhibe la maduración de osteoblastos (Liu W y col., 2001; Maruyama Z y col., 2007; Javed A y col., 2010; Komori T, 2010), y en este día (4) se observó la mayor expresión de *RUNX2* en WJ-MSC sin tratamiento farmacológico (Fig. 11 y 12A). El inhibidor fue renovado cada 48 horas, ya que a mayor frecuencia de recambio se observó un efecto tóxico sobre WJ-MSC. El tratamiento con PBIT no generó un mayor nivel de mineralización en WJ-MSC luego de 20 días en diferenciación osteoblástica (Fig. 19), lo que confirma que existe una restricción intrínseca en WJ-MSC ante el compromiso a linaje osteoblástico. En conclusión, la reducción de la actividad de JARID1B a través del uso del fármaco PBIT en WJ-MSC, es capaz de aumentar la expresión del gen osteoblástico primordial en diferenciación osteoblástica, *RUNX2-P57*, mediante un mecanismo de activación epigenética, no así de potenciar la formación de osteoblastos maduros y el proceso de mineralización en etapas avanzadas. Es necesario evaluar la expresión de otros genes óseos de expresión temprana, intermedia y tardía, como *SP7*, *BGLAP*, *ALP*, *BSP*, y de genes asociados al linaje condrogénico como *SOX9*, durante la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC tratadas con PBIT 1 μ M. En esta oportunidad, la extracción de ARN desde TRIzol para muestras del tratamiento a largo plazo no fue ejecutada correctamente y no fue posible llevar a cabo este análisis para los genes propuestos inicialmente: *RUNX2-P57*, *SP7*, *ALP*, *BSP* y *SOX9*.

Ha sido reportado que otros miembros de la familia de demetilinasas de histonas con dominio Jumonji, también están involucradas en la diferenciación de MSC: JARID1A (Wang C y col., 2016) y JARID1C (Ji X y col., 2015), que poseen constantes de afinidad (IC_{50}) con PBIT de 6 y 4.9 μ M, respectivamente (Sayegh J y col., 2013). Es posible que la actividad de JARID1A y JARID1C se haya visto afectada por PBIT, aunque en menor grado que JARID1B. El rol de estas proteínas ha sido descrito en el contexto de la osteoporosis y el cáncer, sin embargo, las consecuencias de su inhibición durante la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC no han sido estudiadas. Cabe mencionar que KDM6B/JMJD3, perteneciente a la misma familia, y también un potencial blanco de PBIT, regula la expresión de *BSP* y *BGLAP* a través de *RUNX2* y *SP7*, en células precursoras de osteoblastos (Xiang Y y col., 2007; Yang D y col., 2013). Estos antecedentes podrían explicar la merma del efecto de PBIT en la mineralización osteoblástica tardía en WJ-MSC, con respecto a su efectividad en ensayos a corto plazo.

El *knockdown* o silenciamiento de genes mediado por virus es una herramienta de gran utilidad para el estudio de la función génica, ya que se integra en el genoma de manera estable y genera el silenciamiento específico de la expresión del gen blanco por un tiempo prolongado (Van Damme A y col., 2006; Moore C y col., 2010). El silenciamiento de JARID1B permitió confirmar que tiene un rol importante en la regulación de la expresión de *RUNX2-P57* en WJ-MSC (Fig. 20B), en concordancia con lo obtenido por Rojas A y col., 2015 en células C2C12. El silenciamiento de *JARID1B* resulta en un aumento significativo de la abundancia de las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K27Ac en el promotor P1 de *RUNX2-P57* (Fig. 20C y D), lo que evidenciaría la activación transcripcional de *RUNX2* producto de la disminución de la demetilación de residuos H3K4me3. Además, sugiere que existe una coordinación entre JARID1B y la maquinaria

de acetilación que actúa sobre H3K27, la acetil transferasa de histonas, p300 (Ogryzko V y col., 1996; Rojas A y col., 2015). Dado que la inhibición de la actividad enzimática de JARID1B con el fármaco PBIT no tiene efectos sobre la abundancia de H3K27Ac, al contrario de lo observado en el silenciamiento de JARID1B, se sugiere que la unión de JARID1B al promotor P1 impediría el reclutamiento de p300 y, por ende, estaría bloqueando la acetilación de H3K27 (Rojas A y col., 2015). En definitiva, el silenciamiento génico de JARID1B es capaz de aumentar significativamente la expresión de genes osteoblásticos tempranos. No obstante, el lentivirus shJARID1B posee un efecto tóxico sobre las WJ-MSC a tiempos más extensos y, por ende, no es posible evaluar las consecuencias del silenciamiento sobre la mineralización de la diferenciación osteoblástica en WJ-MSC.

WJ-MSC poseen un potencial de diferenciación osteoblástica restringido

El potencial osteoblástico limitado descrito en cultivos primarios de WJ-MSC se manifiesta en que los marcadores fenotípicos tardíos se expresan sólo en grupos minoritarios, mientras que en el mayor porcentaje de la población celular se observa resistencia a entrar al programa de compromiso a linaje óseo. Estudios previos establecieron la existencia de a lo menos dos poblaciones celulares morfológicamente indistinguibles en la gelatina de Wharton, que difieren en cuanto a expresión génica y potencial de diferenciación (Karahuseyinoglu S y col., 2007). Recientemente, se logró determinar que la vía de señalización canónica de Wnt se encuentra regulada negativamente en WJ-MSC, a nivel de ligandos, receptores y blancos celulares. En particular, la disminución de la expresión de los genes *WISP1* (*Wnt1 inducible signaling pathway protein 1*) y *sFRP4* (*secreted Frizzled related protein 4*), resulta ser la principal

responsable del potencial osteoblástico restringido de WJ-MSC (Batsali A y col., 2017). La vía de señalización Wnt es esencial para la regulación de la osteogénesis en MSC y actúa cooperativamente con la vía de BMPs: Wnt/ β -catenina es un activador de la expresión de BMP2, y a su vez, la vía de BMPs modula la expresión génica de la vía Wnt canónica (Zhang R y col., 2013). β -catenina es indispensable ya que reprime la diferenciación condrogénica y favorece la osteoblastogénesis. Por otro lado, la vía no canónica, que es independiente de β -catenina, regula el programa de osificación endocondral y maduración de cartílago en condrocitos (Ling I y col., 2017). Las vías de señalización de BMPs y Wnt actúan de manera cooperativa en la regulación de la diferenciación osteoblástica y en la formación de hueso. Es probable que en la heterogeneidad de los cultivos primarios de WJ-MSC, se distingan células que manifiestan menor resistencia a iniciar el programa de diferenciación osteoblástica debido a que la expresión de algunas proteínas de la vía Wnt, como *WISP1* y *sFRP4*, no está restringida. Como parte de las proyecciones del presente seminario de título, se propone adicionar las moléculas *WISP1* y *sFRP4* al medio inductor de la diferenciación osteoblástica en ensayos con WJ-MSC en tratamiento con PBIT, para obtener un incremento en el potencial osteoblástico, tal como fue reportado en Batsali A y col., 2017. Por otro lado, las WJ-MSC retienen propiedades de “troncalidad estromal primitiva”, ya que provienen de una fase temprana de la ontogénesis (Watson N y col., 2015). Así como otras MSC perinatales (Fig. 22), poseen rasgos compartidos entre pluripotencialidad y multipotencialidad (Pappa K & Anagnou N, 2009). Es por esta razón que, en comparación con MSC adultas como BM-MSC y AD-MSC que poseen mayor grado de compromiso de linaje, las WJ-MSC tienen potenciales de diferenciación adipogénica y osteogénica limitados (La Rocca G y col., 2009; Kouroupis D y col., 2013; Amable P y col., 2014). Es interesante mencionar que en líneas celulares de WJ-MSC

se ha demostrado el compromiso a linaje osteoblástico de manera efectiva al co-cultivar con suplementos de crecimiento de MSC (Zajdel A y col., 2017), y en cultivos primarios de WJ-MSC mediante la adición de aminoácidos no esenciales y glutamina (La Rocca G y col, 2013). Así también, MSC aisladas desde líquido amniótico han sido exitosamente diferenciadas a linaje osteoblástico al ser cultivadas en matrices híbridas de colágeno y el polímero PLGA (Kim J y col., 2013).

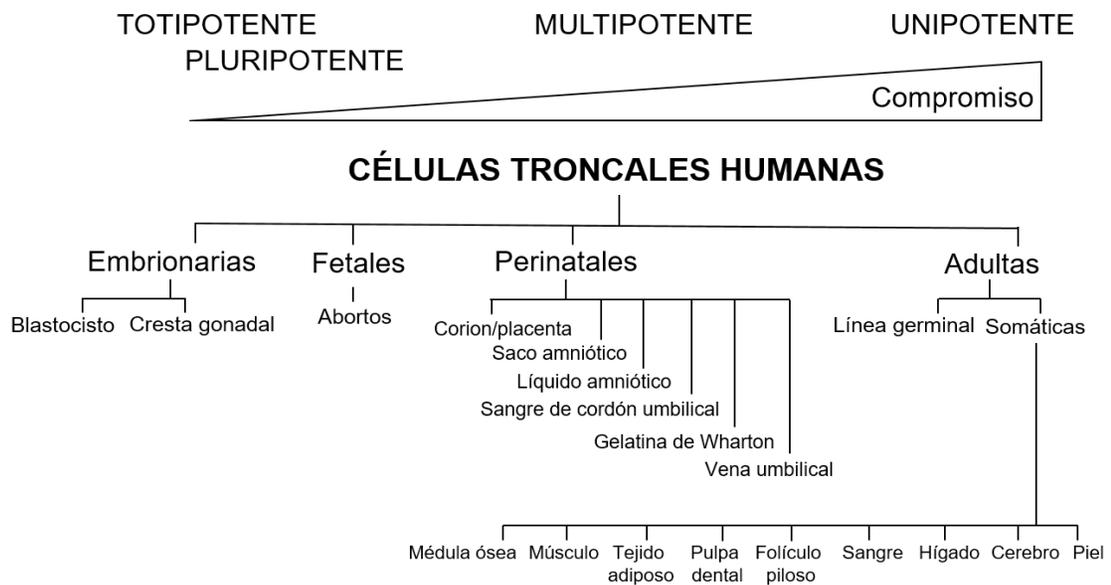


Figura 22. Clasificación de MSC humanas. Las MSC perinatales son células multipotentes aisladas desde los tejidos extra-embriónicos: sangre de cordón umbilical, corion, saco y líquido amniótico, gelatina de Wharton y vena umbilical. Son de origen ontogénico temprano y poseen mayor potencial proliferativo y de diferenciación, en comparación a MSC adultas que son unipotentes. Además, no están asociadas a restricciones éticas en cuanto a su obtención y uso en investigación biomédica. Imagen adaptada de Witkowska-Zimny M & Wrobel E, 2011.

Como parte de las proyecciones de este trabajo, y en base a los antecedentes, se propone ensayar la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC tratadas con PBIT sobre matrices biocompatibles ya descritas en la literatura pertinente, con el objetivo de incrementar el potencial osteoblástico asociado a la maduración de osteoblastos y a la formación de la ECM. Por otra parte, se sugiere incluir BMP2 al medio de cultivo inductor

de la diferenciación osteoblástica para potenciar el proceso en WJ-MSC. Si bien *RUNX2* tiene un papel primordial en la formación de hueso, está bien documentado que otros reguladores participan de manera importante en el compromiso a linaje osteoblástico de MSC a través de mecanismos independientes de *RUNX2*, como *SP7*, *MSX2*, *DLX3* y *DLX5* (Hassan M y col., 2004; Lee M y col., 2005; Matsubara T y col., 2008), *BMP2* (Lee M y col., 2003; Liu T y col., 2007; Biver E y col., 2014; Wu M y col., 2016), y más recientemente, el factor nuclear citoplasmático de células T activadas 1 (*NFATc1*; Fierro F y col., 2017). Es por ello que es necesario evaluar el efecto de otras moléculas, como *BMP2*, en la inducción de la diferenciación osteoblástica de WJ-MSC.

Proponemos que, con el objetivo de optimizar la formación de hueso desde WJ-MSC, se logre enriquecer y seleccionar la sub-población de células en un cultivo primario que manifiesta menor restricción al compromiso a linaje osteoblástico, mediante el análisis de la expresión de marcadores osteoblásticos clásicos como *BGLAP*, *SP7* y *ALP* ante la inducción a diferenciación osteoblástica, y de otras moléculas asociadas al potencial osteoblástico limitado de estas MSC, como *WISP1* y *sFRP4* de la vía de señalización Wnt.

5. CONCLUSIONES

Modelo propuesto

Como se muestra en la Figura 23, mediante la inhibición de la actividad enzimática o el silenciamiento génico de JARID1B en WJ-MSC, se logra aumentar la expresión de *RUNX2-P57*, así como también de otros genes osteoblásticos de expresión temprana o intermedia, directamente modulados por el factor de transcripción maestro *RUNX2*. No obstante, la expresión de genes óseos vinculados a los procesos de mineralización y formación de la ECM, no presenta modificaciones frente a esta estrategia experimental, lo que corrobora la proposición de una barrera epigenética en WJ-MSC ante el compromiso a linaje osteoblástico.

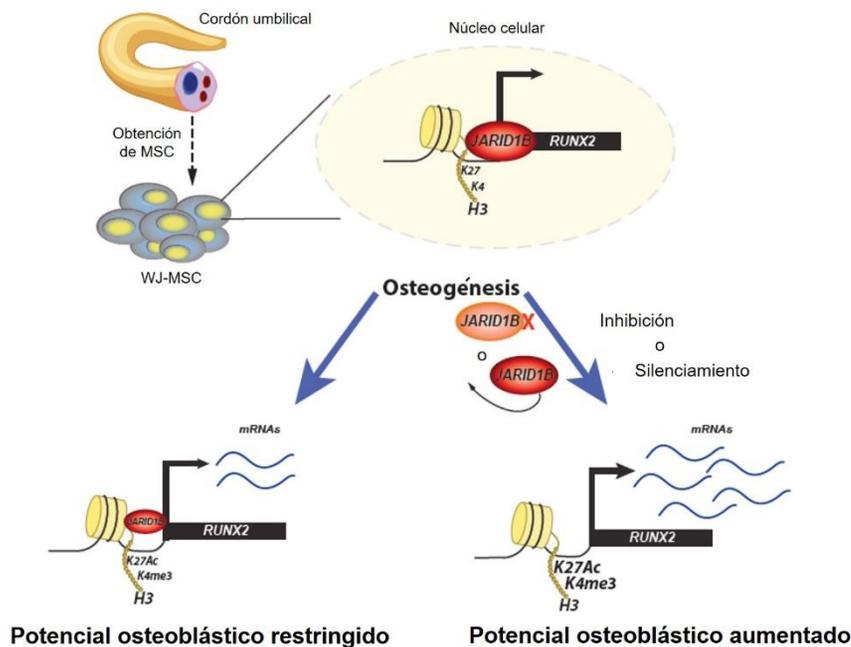


Figura 23. Modelo gráfico. Las WJ-MSC poseen un potencial osteoblástico restringido, evidenciado por una baja concentración de marcas epigenéticas asociadas a elevada actividad transcripcional (*H3K4me3*, *H3K27Ac*) en la zona promotora del factor de transcripción maestro de la osteoblastogénesis *RUNX2*. La reducción de la actividad enzimática por inhibición farmacológica (PBIT) o el silenciamiento mediado por virus, del represor epigenético JARID1B, son métodos efectivos para lograr un aumento significativo de la expresión de *RUNX2-P57* y, por ende, incrementar el potencial osteoblástico de WJ-MSC. Imagen adaptada desde Bustos F y col., 2017 (en revisión en *Stem Cells*).

Las WJ-MSC poseen un enorme potencial clínico, no obstante, para ser empleadas en terapia de regeneración ósea e injertos híbridos en ingeniería de tejidos óseos, se requieren estudios adicionales que permitan dilucidar a cabalidad la restricción intrínseca de estas células a iniciar el programa de diferenciación osteoblástica y formar hueso de manera efectiva. El trabajo aquí expuesto constituye un aporte importante a estudios futuros, ya que refuerza la hipótesis de una barrera a nivel epigenético en WJ-MSC. Además, deja en evidencia que en el compromiso a linaje óseo en WJ-MSC participan una gran cantidad de factores moduladores y vías de señalización, haciendo necesario ampliar el estudio de la regulación de la diferenciación osteoblástica más allá de la expresión de genes óseos clásicos como *RUNX2*. Cabe destacar que el presente seminario de título se basó, en su totalidad, en estudios *in vitro* en cultivos primarios de WJ-MSC, obtenidos desde cordones umbilicales de donantes diferentes y procesados en forma reproducible (Edwards S y col., 2014). A diferencia de los cultivos primarios, el uso de líneas celulares en investigación excluye el factor de la variabilidad intrínseca del material biológico y de la heterogeneidad entre pacientes. Es por esta razón que los resultados presentados en este informe, junto con el trabajo plasmado en Sepúlveda H y col., 2016 y Bustos F y col., 2017 (manuscrito en revisión en la revista *Stem Cells*), constituyen un aporte importante al estudio futuro de las WJ-MSC como fuente celular en ingeniería de tejidos óseos y terapia celular.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad W, Astina K, Budijanto, 2015. *Demographic Transition and Population Ageing*. Mediterranean Journal of Social Sciences 6(3): 213-218.
- Akesson K, Marsh D, Mitchell P, McLellan A, Stenmark J, Pierroz D, Kyer C, Cooper C, 2013. *Capture the Fracture: a Best Practice Framework and global campaign to break the fragility fracture cycle*. Osteoporosis International 27(4): 1569-1576.
- Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, Beaudon C, Jha A, Jackson W, Marcucio R, Miclau T, Healy K, Bahney C, 2016. *Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration*. Bone 83: 197-209.
- Amable P, Telles M, Vieira R, Granjeiro J, Borojevic R, 2014. *Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly*. Stem Cell Research & Therapy 5(53): 1-13.
- Amini A, Laurencin C, Nukavarapu S, 2012. *Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges*. Critical reviews in biomedical engineering 40(5): 363-408.
- Arvidson K, Abdallah B, Applegate L, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, Granchi D, Kassem M, Konttinen Y, Mustafa K, Pioletti D, Sillat T, Finne-Wistrand A, 2011. *Bone regeneration and stem cells*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 15(4): 718-746.
- Asumda F, 2013. *Age-associated changes in the ecological niche: implications for mesenchymal stem cell aging*. Stem Cell Research & Therapy 4(47): 11.
- Baglio S, Pegtel D, Baldini N, 2012. *Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy*. Frontiers in Physiology 3(359): 1-11.
- Bai L, Li D, Li J, Luo Z, Yu S, Cao S, Shen L, Zuo Z, Ma X, 2016. *Bioactive molecules derived from umbilical cord mesenchymal stem cells*. Acta Histochemica 118(8): 761-769.
- Batsali A, Pontikoglou C, Koutroulakis D, Pavlaki K, Damianaki A, Mavroudi I, Alpantaki K, Kouvidi E, Kontakis G, Papadaki H, 2017. *Differential expression of cell cycle and WNT pathway-related genes accounts for differences in the growth and differentiation potential of Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cell Research & Therapy 8(1): 102.
- Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML, 2011. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges*. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering 2: 403-430.
- Biver E, Thouverey C, Magne D, Caverzasio J, 2014. *Crosstalk between tyrosine kinase receptors, GSK3 and BMP2 signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Molecular and Cellular Endocrinology 382(1): 120-130.
- BioInformant Worldwide LLC, 2015. *Complete 2015-16 Induced Pluripotent Stem Cell Industry Report*. Abril 2015. 175p.

Bookout A, Cummins C, Kramer M, Pesola J, Mangelsdorf D, 2006. *High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*. Current Protocols in Molecular Biology 73: 15.8.1-15.8.28.

Brydone AS, Meek D, Maclaine S, 2010. *Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering*. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H, Journal of Engineering in Medicine 224(12): 1329-1343.

Byers B, Guldberg R, Hutmacher D, Garcia A, 2006. *Effects of Runx2 genetic engineering and in vitro maturation of tissue-engineered constructs on the repair of critical size bone defects*. Journal of Biomedical Materials Research: Part A. 76 (3): 646-655.

Cecchi S, Bennet S, Arora M, 2016. *Bone morphogenetic protein-7: Review of signalling and efficacy in fracture healing*. Journal of Orthopaedic Translation 4: 28-34.

Corrao S, La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Farina F, Anzalone R, 2013. *Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells*. Histology and Histopathology 28(10): 1235–1244.

Dallas S, Bonewald L, 2010. *Dynamics of the Transition from Osteoblast to Osteocyte*. Annals of the New York Academy of Sciences 816: 437-443.

De Almeida D, Ferreira M, Franzen J, Weidner C, Frobel J, Zenke M, Costa I, Wagner W, 2016. *Epigenetic Classification of Human Mesenchymal Stromal Cells*. Stem Cell Reports 6(2): 168-175.

Denu R, Nemcek S, Kim J, Mosher D, Bloom D, Hematti P, 2016. *Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable*. Acta Haematologica 136: 85-97.

Dickson G, Buchanan F, Marsh D, Harkin-Jones E, Little U, McCaigue M, 2007. *Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration*. Technology and Health Care 15: 57-67.

Ding D, Chang Y, Shyu W, Lin S, 2015. *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy*. Cell Transplantation 24(3): 339-347.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E, 2006. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy 8(4): 315-317.

Drissi H, Luc Q, Shakoori R, De Sousa-Lopes S, Choi J, Terry A, Hu M, Jones S, Neil J, Lian J, Stein J, Wijnen A, Stein G, 2000. *Transcriptional Autoregulation of the Bone Related CBFA1/RUNX2 Gene*. Journal of Cellular Physiology 184(3): 341-350.

Ducy P, 2000. *Cbfa1: A Molecular Switch in Osteoblast Biology*. Developmental Dynamics 219(4): 461–471.

Edwards S, Zavala G, Prieto C, Elliott M, Martínez S, Egaña JT, Bono MR, Palma V, 2014. *Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration*. Angiogenesis 17(4): 851-866.

Fernández-Vallone V, Romaniukb M, Choi H, Labovsky V, Otaegui J, Chasseing N, 2013. *Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved?* Differentiation 85(1-2): 1-10.

Fierro F, Nolta J, Adamopoulos I, 2017. *Concise Review: Stem Cells in Osteoimmunology*. Stem Cells 35(6): 1461-1467.

Fiorentini E, Granchi D, Leonardi E, Baldini N, Ciapetti G, 2011. *Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells*. International Journal of Artificial Organs 34(10): 998-1011.

Franceschi R, Xiao G, 2003. *Regulation of the Osteoblast-Specific Transcription Factor, Runx2: Responsiveness to Multiple Signal Transduction Pathways*. Journal of Cellular Biochemistry 88: 446-454.

Franceschi R, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E, 2003. *Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation*. Connective Tissue Research 44 Suppl1: 109-116.

Frausin S, Viventi S, Falzacappa L, Quattromani M, Leanza G, Tommasini A, Valencic E, 2015. *Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research*. Acta Histochemica 117(4-5): 329-338.

Gauthaman K, Venugopal J, Yee F, Biswas A, Ramakrishna S, Bongso A, 2011. *Osteogenic Differentiation of Human Wharton's Jelly Stem Cells on Nanofibrous Substrates In Vitro*. Tissue Engineering Part A. 17(1-2): 71-81.

Gawlitta D, Farrell E, Malda J, Creemers L, Alblas J, Dhert W, 2010. *Modulating Endochondral Ossification of Multipotent Stromal Cells for Bone Regeneration*. Tissue Engineering: Part B. Vol. 16(4).

Gold M. A Conspiracy Of Cells, One Woman's Immortal Legacy and The Medical Scandal It Caused. Albany, NY: State Univ. of New York Press; 1986

Hankamolsiri W, Manochantr S, Tantrawatpan C, Tantikanlayaporn D, Tapanadechopone P, Kheolamai P, 2016. *The Effects of High Glucose on Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Gestational Tissue-Derived MSCs*. Stem Cells International 2016, ID 9674614.

Hartmann C, 2009. *Transcriptional networks controlling skeletal development*. Current Opinions in Genetics and Development 19(5): 437-443.

He S, Choi Y, Choi J, Yeo C, Chun C, Lee K, 2009. *Protein Kinase A Regulates the Osteogenic Activity of Osterix*. Journal of Cellular Biochemistry 115: 1808-1815.

He X, Dziak R, Mao K, Genco R, Swithart M, Li C, Yang S, 2013. *Integration of a Novel Injectable Nano Calcium Sulfate/Alginate Scaffold and BMP2 Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells for Bone Regeneration*. Tissue Engineering: Part A. 19(3-4): 508-518.

Hollinger J, Winn S, Bonadio J, 2000. *Options for Tissue Engineering to Address Challenges of the Aging Skeleton*. Tissue Engineering 6(4): 341-350.

Hovhannisyanyan H, Zhang Y, Hassan M, Wu H, Glackin C, Lian J, Stein J, Montecino M, van Stein G, Wijnen A, 2013. *Genomic occupancy of HLH, AP1 and Runx2 motifs within a nuclease sensitive site of the Runx2 gene*. Journal of Cellular Physiology 228: 313–321.

Jaiswal N, Haynesworth S, Caplan A, Bruder S, 1997. *Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro*. Journal of Cellular Biochemistry 64(2): 295-312.

Javed A, Chen H, Ghorri F, 2010. *Genetic and Transcriptional Control of Bone Formation*. Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America 22(3): 283-293.

Kalaszczynska I, Ferdyn K, 2015. *Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance*. BioMed Research International 2015, ID 430847.

Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay G, Demiralp D, Tukun A, Uckan D, Can A, 2007. *Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys*. Stem Cells 25(2): 319-331.

Karantalis V, Hernandez-Schulman I, Balkan W, Hare J, 2015. *Allogeneic Cell Therapy: A New Paradigm in Therapeutics*. Circulatory Research 116(1): 12-15.

Katagiri T, Takahashi N, 2002. *Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation*. Oral diseases 8: 147-159.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K, 2006. *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells 24: 1294–1301.

Kim D, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang S, Borlongan C, 2013. *Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications*. International Journal of Molecular Sciences 14(6): 11692-11712.

Kim J, Jeong S, Ju Y, Yoo J, Smith T, Khang G, Lee S, Atala A, 2013. *In vitro osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells on a poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)-bladder submucosa matrix (BSM) composite scaffold for bone tissue engineering*. Biomedical materials 8(1): 014107 (11pp).

Kinaci A, Neuhaus V, Ring DC, 2014. *Trends in Bone Graft Use in the United States*. Orthopedics 37(9): e783-788.

Komori T, 2010. *Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2*. Cell and Tissue Research 339(1): 189-195.

Komori T, 2011. *Signaling Networks in RUNX2-Dependent Bone Development*. Journal of Cellular Biochemistry 112(3): 750-755.

Konala V, Mamidi M, Bhonde R, Das A, Pochampally R, Pal R, 2016. *The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration*. *Cytotherapy* 18(1): 13-24.

Kouroupis D, Churchman S, English A, Emery P, Giannoudis P, McGonagle D, Jones E, 2013. *Assessment of umbilical cord tissue as a source of mesenchymal stem cell/endothelial cell mixtures for bone regeneration*. *Regenerative medicine* 8(5): 569-581.

Kouzarides T, 2007. *Chromatin Modifications and Their Function*. *Cell* 128(4): 693-705.

Kurata H, Guillot P, Chan J, Fisk N, 2007. *Osterix Induces Osteogenic Gene Expression but not Differentiation in Primary Human Fetal Mesenchymal Stem Cells*. *Tissue Engineering* 13(7): 1513-1523.

La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasa L, Cappello F, Zummo G, Farina F, 2009. *Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: Differentiation potential and detection of new markers*. *Histochemical Cell Biology* 131(2): 267–282.

La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Corrao S, Farina F, Anzalone R, 2013. *Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Maintain the Expression of Key Immunomodulatory Molecules When Subjected to Osteogenic, Adipogenic and Chondrogenic Differentiation In Vitro: New Perspectives for Cellular Therapy*. *Current Stem Cell Research & Therapy* 8: 100-113.

Langenbach F, Handschel J, 2013. *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. *Stem Cell Research & Therapy* 4(5): 117.

Laurencin C, Ashe K, Henry N, Kan H, Lo K, 2014. *Delivery of small molecules for bone regenerative engineering: preclinical studies and potential clinical applications*. *Drug Discovery Today* 19(6): 794–800.

Lee A, Tang C, Rao M, Weissman I, Wu J, 2013. *Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies*. *Nature Medicine* 19(8): 998-1004.

Lee J-S, Lee J-M, Im G-I, 2011. *Electroporation-mediated transfer of Runx2 and Osterix genes to enhance osteogenesis of adipose stem cells*. *Biomaterials* 32(3): 760-768.

Lee K, Kim H, Li Q, Chi X, Ueta C, Komori T, Wozney J, Kim E, Choi J, Ryoo J, Bae S, 2000. *Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor β 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12*. *Molecular and Cellular Biology* 20(23): 8783-8792.

Lee M, Kwon T, Park H, Wozney J, Ryoo H, 2003. *BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309(3): 689-694.

- Lee S-J, Kanga S-W, Doa H-J, Hanb I, Shin D, Kima J-H, Lee S-H, 2010. *Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells*. *Biomaterials* 31(21): 5652-5659.
- Lewiecki E, 2013. *Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases*. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 6(2): 48-57.
- Li X, Huang M, Zheng H, Wang Y, Ren F, Shang Y, Zhai Y, Irwin D, Shi Y, Chen D, Chang Z, 2008. *CHIP promotes Runx2 degradation and negatively regulates osteoblast differentiation*. *Journal of Cell Biology* 181(6): 959-972.
- Ling I, Rochard L, Liao E, 2017. *Distinct requirements of wls, wnt9a, wnt5b and gpc4 in regulating chondrocyte maturation and timing of endochondral ossification*. *Developmental Biology* 421(2): 219-232.
- Liu T, Lee E, 2013. *Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development*. *Tissue Engineering: Part B*. 19: 254–263.
- Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 4ta edición. Nueva York, W. H. Freeman, 2000.
- Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT, 2003. *Diabetes Interferes with the Bone Formation by Affecting the Expression of Transcription Factors that Regulate Osteoblast Differentiation*. *Endocrinology* 144(1): 346–352.
- Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneday T, 2008. *BMP2 Regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during Osteoblast Differentiation*. *The Journal of Biological Chemistry* 283(43): 29119–29125.
- Matthews S, 2005. *Biological activity of bone morphogenetic proteins (BMP's)*. *Injury* 36 Suppl3: 34-37.
- Marcus A, Woodbury D, 2008. *Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard*. *Stem Cells Review Series* 12(3): 730-742.
- Marzona L, Pavolini B, 2009. *Play and players in bone fracture healing match*. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 6(2): 159-162.
- Mesples A, Shu J, Majeed N, Zhaoxia L, Xiang H, 2016. *Adult Stem Cells: Will Nature find a Way?* *Cell, Stem Cells and Regenerative Medicine* 2(1).
- Meyerrose T, Olson S, Pontow S, Kalomoiris S, Jung Y, Annett G, Bauer G, Nolta J, 2010. *Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(12): 1167-1174.
- Meza S, 2003. *Demographic-epidemiologic transition in Chile, 1960–2011*. *Revista Española de Salud Pública* 77(5): 605–613.
- Mishra R, Bishop T, Valerio I, Fisher J, Dean D, 2016. *The potential impact of bone tissue engineering in the clinic*. *Regenerative Medicine* 11(6): 571-587.

Montecino M, Stein G, Stein J, Zaidi K, Aguilar R, 2015. *Multiple levels of epigenetic control for bone biology and pathology*. Bone 81: 6.

Mosna F, Sensebé L, Krampera M, 2010. *Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User's Guide*. Stem Cells and Development 19(10): 1-53.

Mostafa N, Fitzsimmons R, Major P, Adesida A, Jomha N, Jiang H, Uludag H, 2012. *Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Cultured with Dexamethasone, Vitamin D3, Basic Fibroblast Growth Factor, and Bone Morphogenetic Protein-2*. Connective Tissue Research 53(2): 117-131.

Nanaev A, Kohnen G, Milovanov A, Domogatsky S, Kaufmann P, 1997. *Stromal Differentiation and Architecture of the Human Umbilical Cord*. Placenta 18(18): 53-64.

Nauth A, Giannoudis P, Einhorn T, Hankenson K, Friedlaender G, Li R, Schemitsch E, 2010. *Growth Factors: Beyond Bone Morphogenetic Proteins*. Journal of orthopaedic trauma 24(9): 543-546.

Nekanti U, Mohanty L, Venugopal P, Balasubramanian S, Totey S, Ta M, 2010. *Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications*. Stem Cell Research 5(3): 244-254.

Norambuena GA, Khoury M, Jorgensen C, 2012. *Mesenchymal stem cells in osteoarticular pediatric diseases: an update*. Pediatric Research 71(4): 452-458.

Oliver-Vila I, Coca MI, Grau-Vorster M, Pujals-Fonts N, Caminal M, Casamayor-Genesca M, Ortega I, Reales L, Pla A, Blanco M, García J, Vives J, 2016. *Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly*. Cytotherapy 18(1): 25-35.

Orimo H, 2010. *The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease*. Journal of Nippon Medical School 77(1): 4-12.

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N, 2014. *Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions*. Journal of Orthopaedic Surgery and Research 9:18

Orford K & Scadden D, 2008. *Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation*. Nature Reviews Genetics 9(2): 115-128.

Pappa K, Anagnou N, 2009. *Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum?* Regenerative Medicine 4(3): 423-433.

Park S, Kim K, Gwak E, et al. 2015. *Ex vivo bone morphogenetic protein 2 gene delivery using periodontal ligament stem cells for enhanced re-osseointegration in the regenerative treatment of peri-implantitis*. Journal of Biomedical Materials Research: Part A. 103(1): 38-47.

Pike J, Meyer M, St. John H, Benkusky N, 2015. *Epigenetic histone modifications and master regulators as determinants of context dependent nuclear receptor activity in bone cells*. Bone 81: 8.

Porada C, Almeida-Porada G, 2010. *Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(12): 1156-1166.

Post S, Abdallah B, Bentzon J, Kassem M, 2008. *Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. *Bone* 43(1): 32-39.

Rashid H, Ma C, Chen H, Wang H, Hassan M, Sinha K, de Crombrughe B, Javed A, 2014. *Sp7 and Runx2 molecular complex synergistically regulate expression of target genes*. *Connective Tissue Research* 55 Suppl1: 83-87.

Rio D, Ares M, Hannon G, Nilsen T, 2010. *Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent)*. *Cold Spring Harbor Protocols* 5(6): 2010-2013.

Robey P, 2011. *Cell Sources for Bone Regeneration: The Good, the Bad, and the Ugly (But Promising)*. *Tissue Engineering: Part B*. 17(6): 423-430.

Rojas A, Aguilar R, Henriquez B, Lian J, Stein J, Stein G, van Wijnen A, van Zundert B, Allende M, Montecino M, 2015. *Epigenetic control of the bone-master Runx2 gene during osteoblast-lineage commitment by the histone demethylase JARID1B/KDM5B*. *Journal of Biological Chemistry* 290(47): 28329-28342.

Reichert J, Schmalzl J, Prager P, Gilbert F, Quent V, Steinert A, Rudert M, Nöth U, 2013. *Synergistic effect of Indian hedgehog and bone morphogenetic protein-2 gene transfer to increase the osteogenic potential of human mesenchymal stem cells*. *Stem cell research & therapy* 4(5): 105.

Samavedi S, Whittington A, Goldstein A, 2013. *Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior*. *Acta Biomaterialia* 9: 8037–8045.

Santos J, Pandita D, Rodrigues J, Pêgo A, Granja P, Tomás H, 2011. *Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration*. *Current Gene Therapy* 11(1): 46-57.

Sayegh J, Cao J, Zou M, Morales A, Blair L, Norcia M, Hoyer D, Tackett A, Merkel J, Yan Q, 2013. *Identification of Small Molecule Inhibitors of Jumonji AT-rich Interactive Domain 1B (JARID1B) Histone Demethylase by a Sensitive High Throughput Screen*. *Journal of Biological Chemistry* 288(13): 9408-9417.

Schonitzer V, Wirtz R, Ulrich V, Berger T, Karl A, Mutschler W, Schieker M, Bocker W, 2014. *Sox2 Is a Potent Inhibitor of Osteogenic and Adipogenic Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells*. *Cellular Reprogramming* 16(5): 355-365.

Schroeder T, Jensen E, Westendorf J, 2005. *Runx2: A Master Organizer of Gene Transcription in Developing and Maturing Osteoblasts*. *Birth Defects Research: Part C*. 75(3): 213-225.

Sepúlveda H, Aguilar R, Prieto C, Bustos F, Aedo S, Lattus J, van Zundert B, Palma V, Montecino M, 2016. *Epigenetic signatures at the RUNX2-P1 and Sp7 gene promoters control osteogenic lineage commitment of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*. Journal of Cellular Physiology 232(9): 2519-2527.

Song I, Caplan A, Dennis J, 2009. *In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo*. Journal of Orthopaedic Research 27: 916–921.

Stewart M, Stewart A, 2011. *Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action*. Veterinary Clinics of NA: Equine Practice 27(2): 243-261.

Stolzing A, Coleman N, Scutt A. *Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells*. Rejuvenation Research 9: 31-35.

Subramanian A, Fong C, Biswas A, Bongso A, 2015. *Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells*. PLoS ONE 10(6): e0127992.

Suen P, Qin L, 2016. *Sclerostin, an emerging therapeutic target for treating osteoporosis and osteoporotic fracture: A general review*. Journal of Orthopaedic Translation 4: 1-13.

The Joint United Nations Programme on HIV and AIDS (UNAIDS) 2016. *Prevention GAP Report*. En: Global AIDS Update, United Nations General Assembly High-Level Meeting on Ending AIDS, 8-10 de Junio de 2016. Oficina Central de las Naciones Unidas. Nueva York, Estados Unidos.

Tessarz P, Kouzarides T, 2014. *Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics*. Nature Reviews: Molecular Cell Biology. 15(11): 703-708.

Tou L, Quibria N, Alexander J, 2003. *Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7*. Molecular and Cellular Endocrinology 205(1-2): 121-129.

Vakoc C, Mandat S, Olenchock B, Blobel G, 2005. *Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin*. Molecular Cell 19: 381–391.

Vasan M, Neres J, Williams J, Wilson D, Teitelbaum A, Remmel R, Aldrich C, 2010. *Inhibitors of the salicylate synthase (MbtI) from Mycobacterium tuberculosis discovered by high-throughput screening*. ChemMedChem 5: 2079–2087.

Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B, 2014. *Epigenetic mechanisms in bone*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 52(5): 589-608.

Wagner P, Fuentes P, Díaz A, Martínez F, Amenábar P, Schweitzer D, Botello E, Gac H, 2012. *Comparison of Complications and Length of Hospital Stay Between Orthopedic and Orthogeriatric Treatment in Elderly Patients With a Hip Fracture*. Geriatric Orthopaedic Surgery & Rehabilitation 3(2): 55-58.

- Wang B, Huang S, Pan L, Jia S, 2013. *Enhancement of bone formation by genetically engineered human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells expressing Osterix*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology 116(4): 221-229.
- Wang H, Hung S, Peng S, Huang C, Wei H, Guo Y, Fu Y, Lai M, Chen C, 2004. *Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord*. Stem Cells 22(7): 1330-1337.
- Wang J, Huang V, Ye L, Bárcena A, Lin G, Lue T, Li L, 2015. *Identification of Small Activating RNAs that Enhance Endogenous OCT4 Expression in Human Mesenchymal Stem Cells*. Stem Cells and Development 24(3): 345-353.
- Wang R, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon R, Kang R, Mok J, Lee M, Luu H, Shi L, 2014. *Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases*. Genes & Diseases 1(1): 87-105.
- Watson N, Divers R, Kedar R, Mehindru A, Mehindru A, Borlongan MC, Borlongan CV, 2015. *Discarded Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: A Viable Source for Mesenchymal Stem Cells*. Cytotherapy 17(1): 18-24.
- Wobus A, Boheler K, 2005. *Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy*. Physiological Reviews 85(2): 635-678.
- World Health Organization (WHO) 2015. *World Report on Ageing and Health: Fact sheet N°404*, 30 de Septiembre de 2015.
- Zhang L, Zhao Y, Guan Z, Ye J, de Isla N, Stoltz J, 2015. *Application potential of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly in liver tissue engineering*. Bio-medical Materials and Engineering 25 Suppl1: 137-143.
- Zhang X, Yang M, Lin L, Chen P, Ma K, Zhou C, Ao Y, 2006. *Runx2 Overexpression Enhances Osteoblastic Differentiation and Mineralization in Adipose - Derived Stem Cells in vitro and in vivo*. Calcified Tissue International 79(3): 169-178.
- Zoch M, Clemens T, Riddle R, 2016. *New insights into the biology of osteocalcin*. Bone 82: 42-49.
- Xiao C, Zhou H, Liu G, Zhang P, Fu Y, Gu P, Hou H, Tang T, Fan X, 2011. *Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration*. Biomedical Materials 6(1): 015013.
- Zajdel A, Kałucka M, Kokoszka-Mikołaj E, Wilczok A, 2017. *Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord*. The Journal of the Polish Biochemical Society and of the Committee of Biochemistry and Biophysics 64: 5 pp.
- Zhang L, Zhao Y, Guan Z, Ye J, de Isla N, Stoltz J, 2015. *Application potential of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly in liver tissue engineering*. Biomedical materials and engineering 25 Suppl 1: 137-143.

- Zhang Y, Reinberg D, 2006. *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. *Genes Development* 15: 2343–2360.
- Zhao Z, Zhao M, Xiao G, Franceschi R, 2005. *Gene Transfer of the Runx2 Transcription Factor Enhances Osteogenic Activity of Bone Marrow Stromal Cells in Vitro and in Vivo*. *Molecular Therapy* 12(2): 247-253.
- Zhu C, Chang Q, Zou D, Zhang W, Wang S, Zhao J, Yu W, Zhang X, Zhang Z, Jiang X, 2011. *LvBMP-2 gene-modified BMSCs combined with calcium phosphate cement scaffolds for the repair of calvarial defects in rats*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22(8): 1965-1973.