

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

*INGENIERÍA TISULAR: APLICACIÓN DE
CÉLULAS MADRE EN REPARACIÓN DE
DEFECTOS EPIDÉRMICOS.*

DIRECTORES:

Dr. D. Juan Manuel Bellón Caneiro

Dra. Dña. Julia Buján Varela

CELIA CORRALES GÓMEZ

2006

A mi madre

A Alfredo

*“No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz,
sin haber aumentado tus sueños.
No te dejes vencer por el desaliento”*

Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud muy especialmente:

A mis directores de tesis, el Dr. D. Juan Manuel Bellón Caneiro por su espíritu de trabajo, por ofrecerme su orientación en numerosas ocasiones, ejemplo, generosidad y calidad humana, y a la Dra. Dña Julia Buján Varela por introducirme en el conocimiento de la histología, guiarme en el desarrollo de esta tesis y por darme su cariño y acompañamiento en momentos difíciles.

A la Dr. Dña Maria del Carmen Gianonatti Alias por su afabilidad y ayuda ante cualquier problema surgido.

Al Dr. D. Jacinto Navlet Armenta, por facilitarme las cosas y prestarme su ayuda siempre que la he solicitado.

Al Dr. D Natalio García-Honduvilla, por sus enseñanzas en el campo de cultivos celulares que me han permitido llevar a cabo esta tesis, sus consejos a nivel profesional y personal y por su valioso apoyo.

A la Dr. Dña. Gema Pascual Gonzalez por su dedicación, amabilidad y por estar siempre dispuesta a trasmitirme sus conocimientos.

Al Dr. D. Francisco Javier García Esteo, por su ayuda tan valiosa y desinteresada, su entusiasmo en este trabajo y los momentos distendidos que hemos pasado.

A mis compañeros Verónica, Marta, Soraya, Cynthia y Carlos por su buena disposición y el tiempo compartido.

A mi familia, en especial a mi tío Manolo por su empuje e interés, a Toño, Raquel y a mis amigos que también han supuesto para mi un estímulo.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| Las células progenitoras | 11 |
| Control de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células madre | 14 |
| Clasificación de las células madre | 15 |
| Células madre adultas en los tejidos del cuerpo | 21 |
| Tejido muscular esquelético: células madre de músculo estriado | 24 |
| La piel | 30 |
| Cicatrización | 43 |
| Modelos experimentales de cicatrización | 46 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 48 |
| O.1 PRIMER OBJETIVO | 50 |
| O.1.1 Material y Métodos | 50 |
| O.1.2 Resultados | 76 |
| O.1.3 Discusión | 89 |
| O.2 SEGUNDO OBJETIVO | 96 |
| O.2.1 Material y Métodos | 96 |
| O.2.2 Resultados | 105 |
| O.2.3 Discusión | 125 |
| CONCLUSIONES | 160 |
| BIBLIOGRAFÍA | 161 |

RESUMEN

La cicatrización de las heridas, supone un eslabón básico en el proceso curativo y la recuperación plena del estado de salud del paciente. Una adecuada cicatrización de las heridas de la piel es clave en el desarrollo favorable de numerosos cuadros patológicos.

Una herida supone una pérdida de la barrera física que protege a los tejidos de la invasión de gérmenes y permite la pérdida de fluidos vitales, que puede ser dramática en los casos de pacientes con quemaduras. Se han descrito un gran número de complicaciones médicas o quirúrgicas que pueden ser atribuidas a deficiencias en la cicatrización de las heridas siendo una causa importante de la morbilidad e indirectamente, de la mortalidad, que encontramos a nivel hospitalario.

La *Medicina regenerativa*, implica la actuación conjunta, multidisciplinar, de diversos campos de la investigación biomédica trabajando con una metodología propia denominada "*Ingeniería tisular*", cuyas herramientas básicas son Células, Soportes o Matrices y Señales.

La ingeniería tisular, se ha visto enriquecida en los últimos años por la aparición continua de numerosos estudios que intentan aportar más luz sobre la biología de las células madre y sus posibles aplicaciones terapéuticas.

El intento previo de otros autores de obtención de células madre derivadas epidérmicas, con bajas tasas de epitelización y estabilización de la cicatriz en grandes quemados, llevó a plantearnos la posibilidad de utilizar como fuente alternativa las células madre derivadas de músculo (muscle derived stem cell, MDSC) empleadas en otras patologías, pero nunca antes en reparación cutánea.

Como hipótesis de trabajo, nos planteamos, si las células madre musculares podían representar una alternativa eficaz para la reparación de defectos cutáneos excisionales.

Para verificar esta hipótesis, nos propusimos dos objetivos:

- 1) Aislamiento, caracterización y elección del momento para el transplante de las MDSC.
- 2) Aplicación de las MDSC como terapia celular sobre un modelo experimental de defecto excisional cutáneo.

En el primer objetivo se diseñó un protocolo de obtención de MDSC, que se extrajeron a partir de una biopsia del músculo dorsal de conejos blancos de Nueva Zelanda (n=20), y se llevó a cabo su caracterización mediante técnicas inmunohistoquímicas y de Western blot. Estos estudios “*in vitro*” se completaron con un ensayo de proliferación con ^3H -Timidina. Se realizaron además estudios de microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido.

Los resultados obtenidos confirmaban que tras 14 días en cultivo, contábamos con una población celular compuesta principalmente por células precursoras, con capacidad de proliferación, adhesión y migración, lo cual recapitulaba propiedades biológicas, para la aplicación de las mismas en el modelo experimental de cicatrización diseñado en el segundo objetivo.

Las MDSC se aplicaron como terapia celular en un defecto excisional cutáneo de 2 cm de diámetro realizado en la oreja del animal de experimentación. Los defectos se realizaron en la cara dorsal de ambas orejas del animal con un dispositivo rígido, cilíndrico y cortante. Se respetó el tejido correspondiente al pericóndrio del cartílago de la oreja. El sacrificio de los animales se realizó a los 14 días, estableciéndose dos grupos de estudio: grupo I – control (oreja izquierda), (n=10): defectos sin tratamiento, y grupo II (n=10), defectos que fueron tratados con transplante de células madre autólogas (oreja derecha). La población celular, fue marcada con PKH-26 para su seguimiento dentro del defecto. Las heridas se protegieron con una cubierta de polietileno de diseño propio. A continuación, se colocó un collarín alrededor del cuello del animal para evitar que éste manipulara las heridas con sus extremidades.

A nivel macroscópico, los defectos creados fueron evaluados en cuanto a los fenómenos de contracción y recubrimiento. Las áreas de contracción y reepitelización se estudiaron por histomorfometría. Los estudios morfométricos fueron realizados mediante técnicas de análisis de imagen. Para el estudio estadístico se empleó el test de la U de Mann-Whitney.

Los estudios histológicos fueron realizados empleando técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido e inmunohistoquímicos.

Los resultados morfométricos, muestran que el fenómeno de contracción fue significativamente superior en el grupo control que en el tratado (1.83 cm^2 vs 2.72 cm^2 ; * $p < 0.05$). Expresado en porcentaje de contracción observamos un 50.83 ± 12.84 % en el grupo control frente a un 22.25 ± 9.56 % en el grupo sometido a terapia celular. El área de reepitelización fue significativamente mayor en el grupo tratado que en el grupo

control (2.50 cm^2 vs 1.29 cm^2 ; $*p<0.05$). Los respectivos porcentajes de las áreas reepitelizadas fueron de $96.33 \pm 3.09 \%$ vs $70.91 \pm 6.94 \%$.

La microscopía óptica mostró como el proceso cicatricial en las heridas control, avanza a partir de los bordes sanos del defecto. En este proceso encontramos con frecuencia en las áreas más superficiales, células blancas, células de características epiteliales y yemas vasculares. La tinción rojo sirio para la detección del colágeno, reveló la presencia de colágeno tipo III en los defectos control y de colágeno tipo I o maduro en las orejas sembradas. En estos defectos el trazador PKH-26, permitió observar su evolución dentro de la herida. En presencia del sustrato sembrado se observó una superficie continua entre los bordes del defecto. Este sustrato favorece la proliferación y migración de las células desde los bordes sanos. Los queratinocitos proliferaban sobre dicho sustrato y de forma centrípeta, hacia el centro del defecto.

El estudio inmunohistoquímico realizado sobre las muestras control y las sometidas a terapia celular, reveló en ambos casos una ausencia de expresión para vimentina y desmina, mientras que la expresión para α -actina, se localizaba sobre los vasos nativos en los dos grupos de estudio. La expresión de miosina en las muestras control fue mayor que en las heridas tratadas, posiblemente correspondientes a zonas de mayor presencia de miofibroblastos y consecuentemente a áreas de contracción.

Los resultados obtenidos nos permiten formular las siguientes conclusiones:

1.- La población aislada a partir de músculo esquelético, posee las propiedades inherentes a una población de células indiferenciadas y con gran capacidad de proliferación y autorrenovación como lo demuestran los resultados comparados con la población de fibroblastos utilizados como control de células diferenciadas.

2.- Tras 14 días de cultivo, la población de MDSC es indiferenciada, proliferativa y muy adherente, por lo que consideramos que son características idóneas para ser transplantadas como terapia celular sobre un defecto cutáneo excisional.

3.- Los defectos sometidos a terapia celular durante dos semanas, mostraron una significativa disminución del área de contracción del defecto creado, así como una significativa aceleración de la reepitelización con respecto al grupo sin tratamiento alguno.

Las conclusiones anteriores, nos permiten elevar nuestras hipótesis a categoría de tesis y afirmar que:

Las células derivadas de células musculares indiferenciadas MDSC aisladas por nosotros y tras 14 días de cultivo, cumplen los requisitos exigidos para su uso como terapia celular, tanto en número como características de adhesión, proliferación y diferenciación.

Su utilización como terapia celular en un modelo experimental nos permite mejorar significativamente la reparación del defecto excisional creado.

ABSTRACT

Wound healing is a key step in the process whereby a patient's health is fully recovered. Wounds represent the loss of a physical barrier that protects tissues from invasion by microorganisms and allows the loss of fluids, which can be drastic in patients with burns. Further, several medical or surgical complications can be attributed to deficient wound healing. In the intrahospital setting, these may be a significant cause of morbidity and, indirectly, of mortality.

In *regenerative medicine* several areas of biomedical research merge to give rise to *tissue engineering*, whose basic tools are cells, scaffolds or matrices, and signals. Interest in tissue engineering has been recently rekindled by new knowledge emerging on the biology of stem cells and their possible therapeutic applications.

Previous attempts at obtaining epidermal adult stem cells capable of slow epithelialisation and stabilising the healing processes in large burns, prompted us to consider the possibility of using muscle-derived stem cells (MDSC) to aid the wound repair process. These cells have been used in the treatment of other diseases but never for skin repair purposes.

Our working hypothesis was whether MDSC could be an efficient option for the repair of incisional cutaneous defects. To test this hypothesis, we established two main objectives:

- 1) To isolate and characterise MDSC and select the best time for grafting.
- 2) To apply MDSC as cell therapy in an experimental incisional cutaneous wound model.

For the first objective, MDSC were harvested from a biopsy specimen taken from the dorsal muscle of New Zealand White rabbits, and then characterised by immunohistochemical techniques and Western blotting. These *in vitro* studies were completed with a cell proliferation assay based on ^3H -thymidine incorporation. Light microscopy and transmission and scanning electron microscopy studies were also performed.

Fourteen days of culture rendered a cell population comprised mainly of precursor cells capable of proliferation, adhesion and migration, thus reproducing their

biological properties for their application in the skin repair model designed as the second objective of our study.

MDSC were applied to a 2 cm-diameter incisional skin defect created on the ear of the experimental animal. The wounds were made on the back part of both ears using a cutting cylindrical instrument avoiding the perichondrial tissue of the ear cartilage. The animals were sacrificed after 14 days and two study groups established according to whether the wounds were left untreated (Control group, left ear) (n=10) or treated with grafted autologous MDSC (Treatment group, right ear) (n=10). The cultured cells used were labelled with PKH-26 so that they could be traced inside the wound. The wounds were covered with a custom made polyethylene dressing. The rabbit was fitted with a neck collar to prevent it touching the wound.

The wounds were evaluated visually in terms of wound contraction and reepithelialisation established by histomorphometry, including image analysis. Data were compared using the Mann-Whitney U-test.

Light and electron microscopy techniques were used for the histological studies.

Our morphometric data revealed significantly greater wound contraction in the control than treatment group (1.83 cm^2 vs 2.72 cm^2 ; $*p<0.05$). When expressed as a percentage, contraction was $50.83\pm 12.84\%$ in the control group versus $22.25\pm 9.56\%$ for the cell therapy group. A significantly larger reepithelialised area was recorded for the treatment group (2.50 cm^2 vs 1.29 cm^2 ; $*p<0.05$). Percentage reepithelialised areas were $96.33\pm 3.09\%$ vs $70.91\pm 6.94\%$ respectively.

Light microscopy revealed that the repair process in the control wounds commences at the healthy edges of the defect. In surface areas, white blood cells, cells with epithelial characteristics and vascular buds were often found. Sirius red showed the presence of type III collagen in control wounds and type I, or mature collagen, in the seeded wounds. The PKH-26 marker allowed us to monitor the stem cells in the treated wounds. In the presence of the seeded substrate, a continuous surface appeared between the defect's edges. The substrate promotes the proliferation and migration of the cells from the healthy margins inwards. Keratinocytes proliferate in a centripetal manner towards the center of the defect.

The immunohistochemical study performed on control and treated specimens in both cases revealed a lack of vimentin and desmin expression, while labelling for α -actin appeared on native blood vessels in both study groups. The expression of myosin in control specimens was greater than in the treated wounds and possibly corresponded

to zones with more myofibroblasts and therefore to areas of wound contraction. Our findings allowed us to draw the following conclusions:

1.- The cell population isolated from skeletal muscle shows several properties inherent to an undifferentiated population of cells and self renewal, as indicated by the results compared to those observed for the fibroblasts used as the differentiated cell control.

2.- After 14 days of culture, the MDSC are undifferentiated, proliferative and very adherent. These are ideal properties for their application in the repair of incisional skin defects.

3.- Wounds subjected to cell therapy for two weeks experienced significant less contraction of the defect's area as well as a significantly faster reepithelialisation than the control untreated wounds. .

Thus, isolated undifferentiated MDSC cultured for 14 days fulfill all the requirements for their use as cell therapy, both in terms of numbers and adhesion, proliferation and differentiation properties. In an experimental model, the repair of an incisional wound was significantly improved.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de estructura ó función de los tejidos y órganos ha supuesto un motivo de preocupación continua que se intenta solventar mediante transplantes, injertos autólogos, prótesis y regeneración tisular (Falke y Atala, 2000).

Si bien desde el punto de vista médico, la utilización de órganos para transplantes ha supuesto una alternativa real para muchos pacientes, en la actualidad se ve limitada por el escaso número de donantes. Esta creciente necesidad de órganos, ha llevado a los investigadores a buscar nuevas alternativas para la reparación/reconstrucción de órganos y tejidos tratando al mismo tiempo de solventar el problema inmune asociado a todo trasplante.

En este contexto hoy en día se acuña el término de *Medicina Regenerativa*, la cual implica la actuación conjunta, multidisciplinar, de diversos campos de la investigación biomédica. Esta nueva disciplina trabaja con una metodología propia denominada “Ingeniería tisular”, cuyas herramientas básicas son Células y Soportes y Señales.

La ingeniería tisular, basada en el conocimiento de los procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario, pretende simular todos los pasos conducentes a la obtención de un tejido vivo, metabólicamente activo, con capacidad de adaptación. Por y por ello precisa no sólo disponer de los componentes básicos sino además, del conocimiento de los factores a los que va a estar sometido como fuerzas biomecánicas, estrés y envejecimiento que además han de ir sincronizados con el resto de las estructuras corporales.

Para lograr sus objetivos la ingeniería tisular puede seguir diferentes estrategias:

- a. Tratar reparar defectos tisulares o reconstruir los mismos, utilizando los tejidos circundantes “**Terapia guiada**”. Estimular el crecimiento y diferenciación celular mediante soportes más o menos activos que incorporen o no diferentes señales que aceleren ó modulen el proceso de reparación.
- b. “**Terapia celular**”, utiliza la célula como medicamento. Fuentes celulares autólogas o heterólogas en aplicación sistémica o directa del lugar que se ha de reparar para que en el ambiente adecuado estas células regeneren el tejido.
- c. Crear “**Equivalentes tisulares o constructos**” de diseño a medida “*in vitro*” es uno de los retos más innovadores y al mismo tiempo más complejos. En estos

momentos, la consecución de neotejidos incipientes es una de las metas que permitirán acelerar el proceso de regeneración. Estos esbozos de órganos o tejidos al ser colocados en el lugar del implante “*in vivo*” encontrarán el medio ambiente ideal para constituir un tejido definitivo o adulto.

En la mayor parte de las estrategias que utiliza la Ingeniería tisular el elemento principal es, “*La Célula*”

¿Qué sabemos acerca de las células?.

Las células son seres vivos de larga trayectoria evolutiva y con capacidades todavía por explorar. De ser conocidas como parte estática de los tejidos y órganos, han adquirido una nueva dimensión donde una de las características fundamentales va a ser la plasticidad. La determinación y diferenciación celular hechos dogmáticos de antaño, son hoy en día modelos convencionales que han permitido establecer la base del conocimiento actual sobre la estructura y función tisular. La tecnología del aislamiento, expansión, diferenciación y manipulación celular y genética ha abierto nuevos horizontes en los cuales estamos adentrándonos en los comienzos de este nuevo siglo.

Por ello, una proporción importante de las estrategias actuales en ingeniería tisular dependen de una muestra de células.

En los comienzos de la Ingeniería Tisular la fuente celular más preciada eran las células autólogas. Sin embargo esto no siempre es posible, ya que muchos pacientes se encuentran en una fase comprometida por el fallo del órgano en cuestión. Además en situaciones no tan extremas, aún cuando esto no sucediese, aparece otro gran obstáculo como es, la inherente dificultad del tipo celular nativo característico del órgano dañado, para expandirse “*in vitro*”, problema, incluso para órganos que poseen una alta capacidad regenerativa *in vivo* (Atala, 2004), tal es el caso de la piel.

Siempre se trataba de obtener células de la misma estirpe celular, lo cual no era tarea sencilla y en la mayor parte de los casos las células no sobrevivían al trasplante.

La necesidad de fuentes autólogas ha generado la búsqueda y desarrollo de alternativas, así se avanzó en la utilización de las células progenitoras o células madre.

Las células progenitoras

Tras la fusión del gameto femenino y masculino se inicia el proceso de fecundación propiamente dicho. El encuentro del material genético paterno y materno, se continúa con una serie regulada de divisiones mitóticas denominadas segmentación las cuales poseen peculiaridades que las hacen singulares. Desde el punto de vista morfológico, estos blastómeros no van acompañados de crecimiento, sino que cada vez se convierten en células de menor tamaño, sin embargo, estas células son *totipotenciales* es decir poseen todas las capacidades para originar el desarrollo embrionario completo (embrión y cubiertas). Estas células, son *células progenitoras totipotentes*, capaces todas y cada una de ellas, de dar lugar a todos los tipos celulares en el embrión y a los tejidos extra embrionarios necesarios para su implante en la pared uterina. En la especie humana después de la 3ª división (estadio de 8 a 12 células), las divisiones se vuelven asincrónicas y las células se transforman en *pluripotenciales*, forman una masa compacta de células (32 y 128), llamada mórula. Conforme la mórula avanza a lo largo de la trompa, las células continúan dividiéndose formándose una esfera hueca llamada blastocisto, en cuya pared podemos distinguir “trofoblasto” y “embrioblasto”. Las células de la masa interna del blastocisto son *células madre pluripotentes* (Stocum, 2001) ya que pueden diferenciarse hacia todos los tipos de células y tejidos que constituyen un organismo adulto, pero no se consideran totipotenciales pues carecen de la capacidad de originar tanto membranas extraembrionarias como de contribuir a la formación de la placenta, función que asume el trofoblasto.

El implante del embrión en el útero, se produce en la especie humana aproximadamente trascurridas una semana de la fecundación. En este momento, el blastocisto bilaminar sufre una profunda invaginación y se originan una serie de movimientos celulares que dan comienzo a la gastrulación. El resultado de esta etapa, es la formación de tres capas germinales en el embrión en desarrollo: ectodermo, mesodermo, y endodermo.

Células progenitoras ó madre (stem cell SC) forman cada una de las tres capas germinales. La capacidad de diferenciación de éstas, es más restringida que la de las células derivadas de la masa interna del blastocisto. Se describen como células *madre multipotenciales*, ya que únicamente son capaces de dar lugar a un pequeño número de células o tejidos, normalmente restringidos a una línea germinativa particular y no son

capaces de transdiferenciarse para formar derivados de otras líneas germinales (Fischbach y Fischbach, 2004).

De los hechos anteriores, se desprende el establecimiento de una jerarquía de potenciales, justificada por algunos autores (Raff, 2003; Wagers y Weissman, 2004) como la restricción del potencial de desarrollo en el tiempo, conforme avanza la embriogénesis.

En general, se define una SC, como toda célula capaz de autorrenovarse o automantenerse y que además experimenta divisiones asimétricas para generar células diferenciadas (Rao y Mattson, 2001). Se caracteriza además por tener bajo nivel de proliferación.

De cada división *asimétrica*, surge una SC igual que la original y otra célula que puede diferenciarse hacia varias estirpes (multilínea), capaz de originar células madre unipotenciales y éstas otras células que se denominan **“transit-amplifying” o células aceleradoras de tránsito**. Algunos autores prefieren utilizar el término “transit-amplifying” para referirse a la población celular que surge de la célula madre multipotencial, independientemente de la potencialidad celular. Las células aceleradoras de tránsito, son células de ciclo celular corto, que proliferan más rápido que la SC de la cual provienen y tienen una capacidad de autorrenovación limitada. Su finalidad es dar células terminalmente diferenciadas cuyo último destino es una inminente muerte celular, pero en algunas circunstancias, pueden revertir su dirección y adquirir fenotipo de SC (Alison y cols., 2002).

En ocasiones las células madre pueden sufrir *apoptosis* y no participar más en desarrollos posteriores, es el caso de tejidos como el cerebro donde la renovación de células diferenciadas (neuronas y células gliales) es muy bajo.

En otras situaciones las SC pueden *transdiferenciarse*, término referido a las células que no siguen su proceso restringido de diferenciación normal, pero que pueden transitar hacia otra clase de célula madre. La capacidad de diferenciarse hacia fenotipos no restringidos a su tejido de origen o a la línea germinativa de la cual derivan se denomina *plasticidad* (Bianchi y cols., 2001). Este proceso disminuirá la cantidad de células madre produciendo diferenciación aberrante. Si bien en ocasiones, esto puede ser beneficioso. Kondo y Raff en el año 2000 mostraron cómo células precursoras de oligodendrocitos podían transdiferenciarse hacia células madre pluripotenciales con capacidad para formar neuronas lo que puede ser de utilidad en procesos de degeneración neuronal.

Las células madre pueden experimentar también divisiones simétricas para originar dos SC como la original que seguirán autorrenovándose. Una de ellas dará progenie diferenciada y la otra es susceptible de experimentar cualquiera de los procesos anteriores.

El número de células madre y el proceso de diferenciación, están regulados según las demandas de cada momento, manteniéndose una cantidad adecuada de células precursoras indiferenciadas y de progenie diferenciada. Además, las células precursoras indiferenciadas que resulten de los procesos de división, pueden permanecer quiescentes hasta estadios tardíos del desarrollo o estar disponibles para situaciones de estrés (Rao y Mattson, 2001).

Con poca frecuencia, las SC experimentan otro proceso conocido como *transformación* que supone la pérdida del control celular normal y constituye el factor desencadenante inicial de la formación de los tumores cancerígenos.

Los tumores son en esencia tejidos, formados por una mezcla heterogénea de células con autonomía para producir, sino todos, la mayoría de los mediadores biológicos que necesitan para crecer, llegando incluso a metastatizar en lugares lejanos para comenzar de nuevo la formación tumoral. Para tumores capaces de colonizar un sitio distante y prosperar, o para tumores capaces de recidivar después de intervenciones quirúrgicas debe existir una subpoblación de células que sirva de recurso de renovación de las células tumorales (Presnell y cols., 2002). La existencia de células madre tumorales se demostró por primera vez en 1958 por Hewitt después de transplantar diluciones seriadas de células leucémicas de ratón en animales isogénicos. El concepto de célula madre tumoral se desarrolló más tarde por Trott en 1994, quien sugirió la hipótesis de que algo menos de un 1% de las células que constituyen un tumor se comportan igual que las células madre descritas en los tejidos normales.

Las células madre tumorales se dividen dando lugar a células que retienen el fenotipo de la célula madre tumoral, y a otras células aceleradoras de tránsito que llegarán a diferenciarse y formar el tipo celular predominante en el tumor. Esta hipótesis se apoya en la observación experimental, de que los tumores, a menudo muestran un grado de diferenciación celular similar al tejido originario del tumor, y en que además, las células diferenciadas del tumor tienen un índice mitótico similar o sólo ligeramente mayor que el índice mitótico de tejidos no tumorales, sugiriendo que, la masa tumoral se sustenta por la proliferación del compartimento de células madre derivadas, seguido

de la diferenciación de células aceleradoras de tránsito hacia células de fenotipo tisular específico (Rudland, 1987; Lampkin, 1985).

Parece lógico pensar que las células madre tisulares pueden ser dianas de muchos tipos de cáncer por dos motivos: algunos como el de piel, puede llegar a producirse en edades tempranas (Crijns y cols., 1997) aunque frecuentemente las manifestaciones clínicas aparezcan más tarde. Esto se justifica con la existencia de algún error que motive que las células normales que deben regenerarse no puedan llegar a diferenciarse por completo, permaneciendo quiescentes en la epidermis durante años, o que por el contrario, sean las células madre epidérmicas con información cancerígena las que permanezcan quiescentes durante años (Morris y cols., 1997). Otro motivo puede ser que los tumores que derivan de algunos tejidos expresan a menudo proteínas asociadas con células embrionarias o con otras células madre, en este sentido, varias rutas de señalización (Notch, Wnt, y Sonic hedgehog) implicadas en la autorrenovación y mantenimiento de la multipotencialidad de las SC, se han asociado con la carcinogénesis en el sistema hematopoyético, en el colón y en el pulmón (Reya y cols., 2001).

Control de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células madre

Existen mecanismos moleculares que condicionan a la célula madre a proliferar o diferenciarse, a vivir o experimentar apoptosis, e incluso en ocasiones a desarrollar estados cancerosos. En las diversas rutas moleculares implicadas, participan diversos tipos de proteínas:

Receptor de membrana Notch.

Se han identificado cuatro isoformas de este receptor en los mamíferos (Notch 1-4). Fundamentalmente, el Notch1 juega un importante papel en la determinación del destino celular durante el desarrollo, lo que se pone de manifiesto en ratones con ausencia de este receptor que desarrollan defectos en la formación de los somitas y anomalías en la neurogénesis y la hematopoyesis (Conlon y cols., 1995).

Altos niveles del Notch se asocian con procesos de división celular, mientras que células con bajos niveles tienden a diferenciarse. En las SC de los mamíferos la función del Notch en cuanto a diferenciación y proliferación puede ser modificada por ciertos factores. Algunas proteínas citoplásmicas como la Numb, modifican la señalización del

Notch interaccionando con su dominio citoplasmático y desempeñando un papel antagonista del Notch en el destino de la célula (Guo y cols., 1996).

Receptores tipo Integrina.

Son heterodímeros constituidos por subunidades α y β de glicoproteínas transmembrana. Median de modo directo las adhesiones célula-célula y célula-matriz extracelular o regulan las rutas de señalización en las que intervienen otras moléculas de adhesión celular, transduciendo las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular en varias de las respuestas celulares, incluyendo cambios en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Las integrinas se activan por unión a proteínas de la matriz extracelular, como la laminina, o por unión a integrinas de la membrana de otras células (Rao y Mattson, 2001).

Telomerasas.

Se localizan en el extremo de los cromosomas. Son ribonucleoproteínas que adicionan secuencias repetidas a los extremos de los cromosomas y están implicadas en el mantenimiento de la longitud de éstos, desempeñando un importante papel en la capacidad de replicación a lo largo de la vida celular (Harley, 1991). Se expresan en altos niveles durante los distintos estadios del embrión en desarrollo, en células de la línea germinal con alta capacidad proliferativa y en los tejidos embrionarios (Wright y cols., 1996) y también en menor medida conforme las células se van diferenciando, llegando a estar ausente en muchos tejidos somáticos en el adulto.

En otras ocasiones, las telomerasas pueden prevenir la apoptosis suprimiendo rutas implicadas en la muerte celular programada en la que interviene la proteína p53 o proteína supresora de tumores (Fu y cols., 1999, 2000).

Otros factores influirán además en el comportamiento celular: los derivados de la actividad metabólica como la temperatura y los niveles de oxígeno, mediadores moleculares como las hormonas y las proteínas biológicamente activas, y moléculas de la matriz extracelular entre otros (Presnell y cols., 2002).

Clasificación de las células madre

El compartimento de células madre, se puede dividir arbitrariamente en dos: compartimento de células madre embrionarias (embryonic stem cell, ESC) y

compartimento de células madre tisular específicas o células madre adultas (adult stem cell, ASC).

Células madre embrionarias

Las ESC son células inmortales, capaces de autorrenovarse perpetuamente en cultivo mientras mantienen un fenotipo indiferenciado y un cariotipo normal (Gerecht-Nir e Itskovitz-Eldor, 2004a).

Tras la experiencia previa de trabajos realizados con embriones de ratón, en el año 1998 Thomson y cols. consiguieron aislar células madre embrionarias humanas.

Existen dos fuentes de obtención de ESC. Se han aislado con éxito, a partir de células de la masa interna de blastocistos y pueden mantenerse en cultivo bajo condiciones en las que se pueden propagar indefinidamente en estado indiferenciado pluripotencial. Son las denominadas *células madre embrionarias pluripotenciales* (Thomson y cols., 1998). Otros autores han empleado células germinales primordiales de la cresta gonadal de fetos de 5 a 10 semanas, estas se conocen como *células madre embrionarias germinales* (Matsuri y cols., 1992). Las *células madre embrionarias pluripotenciales* pueden dividirse hasta 300 veces y se pueden subcultivar “*in vitro*” durante un año, sin embargo, las *células madre germinales* pueden proliferar unas 80 veces (Thomson y cols., 1998; Odorico y cols., 2001).

Para conseguir su propagación “*in vitro*” en estado indiferenciado, son indispensables la presencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF) y una lámina sustento de fibroblastos murinos (Smith y cols., 1998; Williams y cols., 1998). La diferenciación “*in vitro*” de células madre embrionarias humanas, se puede lograr tras la retirada del LIF o de la capa sustento de fibroblastos. Seguidamente se inicia la formación de agregados en suspensión que se denominan cuerpos embrionarios. La formación de cuerpos embrionarios también sucede si no se utilizan frascos de cultivo adherentes en los que se favorezca una suspensión celular. Los cuerpos embrionarios son capaces de dar lugar a tipos celulares de las tres líneas germinales (Sadiq y Gerber, 2004), y se componen de células diferenciadas y precursoras provenientes de diversas líneas distribuidas al azar, que se parecen a embriones postimplante precoces (Henningson y cols., 2003).

La expansión en cultivo en estado indiferenciado, pudo lograrse posteriormente con soportes de matrigel o laminina en presencia de medio condicionado de fibroblastos murinos (Xu y cols., 2001). Estas situaciones suponen una fuente de transmisión de agentes patógenos del ratón a las células madre embrionarias humanas, limitando bastante su aplicación en clínica. Para solventar este problema, se han cultivado más recientemente sobre fibronectina en presencia de factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2) y factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Amit y cols., 2004). En otras ocasiones, se han empleado medios de cultivo de origen humano (Gerecht-Nir e Itskovitz-Eldor, 2004a).

Estos cultivos de ESC de *larga duración*, tienen altos niveles de telomerasa activa y mantienen largos telómeros, ambos hallazgos son considerados marcadores de células proliferantes (Thomson y cols., 1998). La expresión de telomerasa se relaciona en gran medida con la inmortalidad en las líneas celulares humanas, de tal forma que la introducción de la actividad telomerasa en algunas células somáticas diploides estimula su replicación (Bodnar y cols., 1998). En condiciones normales, las células somáticas al no expresar altos niveles de telomerasa experimentan senescencia entre el 50 y 80 subcultivo (Odorico y cols., 2001).

Han sido múltiples las líneas celulares diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas: células neuronales (Schult y cols., 2003; Pan y cols., 2005), cardiomiocitos (He y cols., 2003), células endoteliales y células musculares lisas (Gerecht-Nir y cols., 2003), células hematopoyéticas (Cerdan y cols., 2004), células osteogénicas (Sottile y cols., 2003), células epidérmicas (Green y cols., 2003), células hepatocíticas (Rambhatla y cols., 2003) y células productoras de insulina (Segev y cols., 2004).

Sin embargo, la utilización de SC con aplicaciones terapéuticas, requiere definir y establecer las condiciones de cultivo que permitirán su adecuada diferenciación, mantenimiento y expansión "*in vitro*", conservando en todo momento todas las características de célula madre pluripotencial: cariotipo normal, proliferación estable, alta actividad de telomerasa y capacidad de diferenciarse hacia las tres líneas germinales tanto "*in vitro*" como "*in vivo*". Las condiciones de cultivo más novedosas para lograr la expansión celular en estado indiferenciado pluripotencial, son difíciles de realizar cuando se intenta llevar a cabo la expansión de las células evitando la formación de cuerpos embrionarios. Otras condiciones más sencillas, como someter los frascos de cultivo a movimientos rotacionales no siempre resultan eficaces, pues al cabo de algún

tiempo empiezan a observarse pequeños agregados celulares. Otras técnicas como la agitación continua del cultivo pueden precipitar un daño celular masivo (Gerecht-Nir e Itskovitz-Eldor, 2004 b).

Si lo que se pretende es la diferenciación de las células hacia ciertas líneas específicas, es indispensable realizar modificaciones adecuadas en el medio de cultivo (Schuldiner y cols., 2000).

La selección y expansión celular de poblaciones puras del tipo celular deseado y los problemas de tolerancia inmunológica que se presentan al utilizar células alogénicas, suponen hoy en día los obstáculos mayores para la aplicación de las ESC en terapia regenerativa (Gerecht-Nir e Itskovitz-Eldor, 2004 a). Para purificar los cultivos, se pueden emplear microesferas fluorescentes o magnéticas unidas a un anticuerpo, que reconozca específicamente un marcador de superficie presente en el tipo celular que se pretende seleccionar; para que esto sea efectivo del todo, el marcador debe ser único para el tipo celular de interés y hasta la fecha no existen marcadores de superficie reconocidos como específicos, ni anticuerpos que sean totalmente satisfactorios (Bishop y cols., 2002).

Los problemas de tolerancia inmunológica se han intentado resolver con técnicas de transferencia nuclear somática o clonación. Se basan en transferir el núcleo de una célula somática del propio individuo a un oocito denucleado, y permitir que llegue al estado de blastocisto para poder aislar las células de su masa interna, que serán genéticamente iguales que las de los tejidos del donante (Bishop y cols., 2002). En otras ocasiones y debido a que la utilización de drogas inmunosupresoras está asociada a notables efectos secundarios, se propone la modificación genética de las células madre (para reducir así la inmunogenicidad), insertando moléculas inmunosupresoras como la Fas ligando, o eliminando proteínas inmunoreactivas como el antígeno B7 (Walker y cols., 1997; Harlan y Kirk, 1999).

La identificación del estadio más adecuado de diferenciación en el que deben encontrarse las ESC si se pretenden aplicar en terapia celular, así como el demostrar que al ser trasplantadas son capaces de integrarse, funcionar y sobrevivir en el tejido receptor, son cuestiones que todavía están sin determinar.

La formación de teratomas benignos que tiene lugar cuando estas células son inyectadas vía intramuscular o subcutánea en ratones inmunodeprimidos y de teratomas malignos si se inyectan en ratones normales, hace temer la posibilidad de la formación

de los mismos si estas células se trasplantaran en pacientes humanos con fines regenerativos (Martin, 1980; Papaioannou, 1993).

No obstante el modelo de inducción de teratomas, ha sido útil para el estudio del potencial de desarrollo de las células madre humanas hacia líneas específicas, pues se ha observado que los teratomas desarrollados en ratones inmunodeprimidos poseen tejidos en estado de diferenciación avanzado procedentes de las tres líneas germinales (Thomson y cols., 1998). Además se considera de mayor utilidad, para reproducir las interacciones epitelio-mesénquima que ocurren durante la embriogénesis normal, que el estudio de la diferenciación a partir de cuerpos embrionarios (Henningson y cols., 2003).

También se ha sugerido que podría ser útil para estudiar el crecimiento e invasión tumorales, así como para el seguimiento de la respuesta angiogénica originada en el teratoma humano (Tzukerman y cols., 2003).

Células madre adultas

Son células que residen en nichos específicos o compartimentos tisulares, cuya función es el mantenimiento de la integridad tisular (Vats y cols., 2002). Se consideran además, directamente implicadas en la reparación ante una agresión o lesión.

Los fenómenos de reparación tisular, implican el reemplazo de los tipos celulares dañados con el fin de reestablecer la función e histoarquitectura tisulares. Existen tres teorías para explicar estos fenómenos en los individuos adultos:

1. Teoría de la desdiferenciación.

Propuesta en 1971 por Toole y Gross, en base a los estudios realizados en anfibios para explicar la regeneración completa de una extremidad tras su pérdida traumática. Estos autores afirman, que ocurre por un proceso de desdiferenciación de las células presentes en el tejido dañado. Esta teoría, partía de la base de la no existencia de las SC dentro de los tejidos o de su no participación dentro de los procesos de reparación tisular. Las células diferenciadas dañadas durante el trauma inicial, revierten a un estado indiferenciado más primitivo antes de su proliferación y posterior rediferenciación para restaurar los tejidos perdidos (Stocum, 1998; Tsai y cols., 2002).

2. Teoría de la transdiferenciación.

Esta teoría ofrece una explicación alternativa. Propone que cada tejido en el individuo adulto contiene un único tipo de células progenitoras específicas cuya función se limita al mantenimiento y reparación del tejido en el que residen (Donovan y Gearhart., 2001). La transdiferenciación ocurre durante la reparación tisular cuando las células progenitoras tisulares específicas derivadas de un órgano, son “reprogramadas” para formar tejidos de otro órgano (Forbes y cols., 2002a; Poulosom y cols., 2002).

3. Activación de células quiescentes precursoras de reserva.

Propone que existen poblaciones *precursoras* de reserva en los compartimentos tisulares conectivos y que estas poblaciones están formadas por: a) células progenitoras tisulares específicas, b) células madre de línea germinal y c) células madre pluripotenciales.

a) Se ha postulado que las células progenitoras tisulares específicas que residen en los tejidos del cuerpo que están implicadas en el mantenimiento “rutinario” de esos tejidos. Ejemplos característicos de ello, son las células epiteliales basales de la mucosa gastrointestinal (Bjerknes y Cheng, 2002) y las células miosatélite del músculo estriado (Grounds y cols., 1992; Beauchamp y cols., 2000). Por otra parte sugiere, que las otras dos poblaciones de los compartimentos tisulares, células madre pluripotentes y células madre de línea germinativa, experimentarían activación, proliferación y diferenciación para colaborar con las células progenitoras tisulares cuando fuera necesario, en la restauración o reemplazo de los tejidos perdidos o dañados (Young, 2004 a).

En particular, estos últimos autores, han desarrollado durante años y hasta la actualidad, diferentes trabajos para demostrar la existencia de células madre pluripotentes y células madre de línea germinativa dentro de los tejidos. En estos trabajos se apoyan los fundamentos de esta tercera teoría.

b) Así lograron determinar que las células madre tisulares de línea germinal: poseen un tamaño entre 10 y 20 μ y se propagan más de 200 veces sin perder el potencial de diferenciación (Young, 2000; Young y cols., 2001a y b); permanecen quiescentes en medio sin suero y en ausencia de factor inhibidor de leucemia (LIF); no expresan marcadores de célula madre embrionaria como el antígeno específico del estado embrionario, antígeno carcinoembrionario o molécula de adhesión carcinoembrionaria; y que en presencia de factores proliferantes muestran inhibición por

contacto en la confluencia y un cese de la proliferación cuando una única capa de células cubre la superficie de cultivo (Young y cols., 2001a).

c) Las células madre pluripotenciales derivadas de tejidos adultos conectivos humanos, se diferencian de las anteriores, en que expresan marcadores de célula madre embrionaria y generan tipos celulares de las tres líneas germinales (Young y cols., 2004b).

Finalmente proponen que la activación de células quiescentes precursoras, junto con la desdiferenciación y la transdiferenciación, podrían dar una explicación a los procesos de reparación tisular (Young y cols., 2004b).

Cuando el tejido es alterado en su estructura básica a través de un fenómeno lesivo y se requiere de diversos tipos celulares para su reparación, se pueden activar células pluripotenciales para restaurar el estado tisular previo a la lesión (Weissman y cols., 2001).

Células madre adultas en los tejidos del cuerpo

Existen SC en la mayoría de los órganos del adulto, aunque sólo están bien caracterizadas en ciertos tejidos:

- *Células madre de médula ósea*

La médula ósea es un tejido complejo, sinusoidal y bien organizado que se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos, del esternón, de los huesos que integran la pelvis y de las vértebras esponjosas. Posee dos poblaciones de SC bien diferenciadas, *células madre mesenquimales* y *células madre hematopoyéticas*.

Las primeras, residen en el estroma medular y representan tan sólo del 0.001 al 0.01% del total de la población celular de la médula (Pittenger y cols., 1999). Identificadas por primera vez en la rata en el año 1996 por Friedenstein y Petrakova, en humanos generalmente se aíslan de la crestra ilíaca superior de la pelvis (Digirolamo y cols., 1999; Pittenger y cols., 1999) y/o de la tibia o el fémur (Murphy y cols., 2002; Oreffo y cols., 1998). Poseen la capacidad de diferenciarse en líneas celulares de tejido conectivo, bien sea de hueso, grasa, cartílago o músculo (Barry y Murphy, 2004). Constituyen el estroma soporte de las células madre hematopoyéticas que se diferencian hacia todas las líneas sanguíneas.

La supervivencia y desarrollo de las células madre hematopoyéticas, queda modulada por el microambiente medular, constituido mayoritariamente por una población homogénea de células fibroblásticas cuya función principal, es inducir su proliferación y diferenciación a través de la secreción autocrina y paracrina de factores de crecimiento (Bianchi de Di Risio y cols., 2004).

En sangre periférica también residen células madre hematopoyéticas. Su frecuencia es baja, entre 1:10.000 y 1:100.000 del total de las células sanguíneas.

- *Células madre neuronales*

Tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Se han aislado de diversas áreas del cerebro de embriones de ratones y también del sistema nervioso central de animales adultos. En la actualidad, se estudian los posibles usos de estas células en terapia regenerativa tras daño cerebral o enfermedades degenerativas cerebrales, en especial para situaciones de isquemia cerebral y enfermedad de Parkinson respectivamente (Kennea y Mehmet, 2002).

- *Células madre hepáticas*

En individuos adultos sanos, existen tres poblaciones de SC en estado quiescente con capacidad de regeneración hepática: los propios *hepatocitos*, las *células ovals* localizadas dentro de las ramas más pequeñas del árbol intrahepático biliar y las *células madre hematopoyéticas de la médula ósea* con capacidad de originar hepatocitos entre otros tipos celulares (Forbes y cols., 2002b).

- *Células madre pancreáticas*

Las células madre del páncreas están todavía sin identificar. Se postulan varios tipos celulares como posibles candidatos. Dentro del conducto pancreático, las *células epiteliales*, que se desdiferencian en células madre de fenotipo mesenquimal o *células madre quiescentes* que se activan. Y en los islotes pancreáticos, las *células nestina positivas*, capaces de mostrar en cultivo hormonas como, la insulina, el glucagón, la somatostatina y el polipéptido pancreático (Bonner-Weir y Sharma, 2002).

Este desconocimiento ha motivado que para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I, que supone la destrucción autoinmune de los islotes β -pancreáticos, se hayan desarrollado células secretoras de insulina, a partir de células madre aisladas de

otros tejidos como la médula ósea, el hígado y el epitelio intestinal (Suen y Leung, 2005).

- *Células madre pulmonares*

Varias poblaciones celulares pueden restaurar el pulmón dañado: las *células madre traqueales*, las *bronquiales*, las *células claras* de los bronquiolos y los *neumocitos tipo II* de los alveolos (Otto, 2002).

- *Células madre cardíacas*

Durante años ha existido la creencia generalizada de que el corazón carece de células madre capaces de autorrenovarse y diferenciarse en células terminalmente funcionales. Además los propios cardiomiocitos, son células diferenciadas incapaces de dividirse y regenerar el corazón dañado (Hughes, 2002). Por ello, la búsqueda terapéutica se ha centrado en la utilización de otras SC para la regeneración miocárdica; para este fin se han utilizado sobre todo, las células madre procedentes de médula ósea (Stamm y cols., 2003; Hattan y cols., 2005), las células madre embrionarias (Menard y cols., 2005) y las células satélite del músculo estriado (Mirabet y cols., 2000); si bien recientemente, se ha identificado una población de células madre dentro del corazón con capacidad de regeneración miocárdica y de recuperación de la función cardíaca (Urbanek y cols., 2005).

- *Células madre gastrointestinales*

Son células madre multipotenciales que originan todas las líneas del epitelio gastrointestinal y pueden regenerar por completo las criptas intestinales y las glándulas gástricas. Toman parte en la homeostasis normal del tracto gastrointestinal, interviniendo en el reemplazo de las líneas celulares epiteliales que se renuevan en un plazo que oscila entre dos y siete días (Brittan y Wright, 2002).

- *Células madre epidérmicas*

Las SC de la piel, se localizan en el estrato epidérmico basal y dan origen a los queratinocitos maduros, vía células aceleradoras de tránsito que se dividen de tres a cinco veces antes de originar la célula diferenciada (Potten, 1981; Watt, 1998). Al ser un tejido que experimenta una renovación constante, la utilización de estos

“intermediarios” puede protegernos de posibles transformaciones neoplásicas (Janes y cols., 2002). Cabe mencionar además, el compartimento de las células madre del folículo piloso.

- *Células madre de tejido adiposo*

Caracterizadas y aisladas recientemente del tejido adiposo de personas jóvenes, son células multipotenciales que poseen una extensa capacidad de autorrenovación, muestran un cariotipo diploide normal y pueden diferenciarse hacia tipos celulares de la línea mesenquimal (Rodríguez y cols., 2005).

- *Células madre de músculo liso*

Se han identificado *células progenitoras de músculo liso* tanto en la capa adventicia de vasos sanguíneos de animales, como en la sangre periférica humana. Existen datos que sostienen que contribuyen a la formación de la neoíntima. Sin embargo se desconoce tanto el origen, como el nicho que albergaría a esta población celular (Roberts y cols., 2005).

Tejido muscular esquelético: células madre de músculo estriado

El tejido muscular esquelético se inserta en los huesos, origina movimiento y mantiene la postura corporal. Durante el desarrollo embrionario, todo el músculo esquelético deriva de los pares de somitas que flanquean el tubo neural desde la parte rostral al extremo caudal del embrión, excepto los músculos de la cabeza, que derivan del disco lateral mesodérmico (Christ y Ordahl, 1995). Cada somita se dividirá en una región ventral o *esclerotomo*, cuyas células migrarán alrededor del tubo neural y darán lugar a las vértebras y al esqueleto axial (Dale y Pourquieo, 2000; Aoyama y Asamoto, 1988) y en una región dorsal o *dermomiótomo* cuyas células originarán la dermis de la parte dorsal del embrión, los músculos profundos de la espalda, los compartimentos corporales y la musculatura esquelética de las extremidades (Ordahl y LeDouarin, 1992).

Los músculos esqueléticos, se componen de fascículos formados por fibras musculares individuales repletas de subunidades de disposición longitudinal,

denominadas miofibrillas. Las miofibrillas son multinucleadas y sus núcleos se sitúan dentro del sarcoplasma, en la periferia de la fibra muscular (Hawke y Garry, 2001).

Los *precursores miogénicos* o *células madre progenitoras* se identificaron por primera vez en el dermomiótomo y se caracterizan por la expresión de los factores de transcripción Pax-3 y Pax-7. Posteriormente y en respuesta a las señales Wnts y Sonic hedgehog que provienen de otras estructuras cercanas al embrión, se activan los genes de determinación miogénica *Myf-5* y *MyoD* (Pownall y cols., 2002). Tras la disminución de la expresión génica de los factores Pax, las *células precursoras de músculo destinadas a la línea muscular esquelética* o *mioblastos*, se translocan al miótomo subyacente donde factores de regulación de la miogénesis (miogenic regulatory factors, MRF) como la miogenina y el MRF4 dirigen la diferenciación y fusión en *miofibrillas multinucleadas*.

En el músculo esquelético adulto residen tres poblaciones de células madre: las *células madre derivadas de músculo* (muscle-derived stem cell, MDSC), las *células satélite* y las *células madre de músculo asociadas a la vasculatura*.

Células madre derivadas de músculo:

Son células madre mesenquimales análogas a los *precursores miogénicos embrionarios* o *células madre progenitoras* del músculo esquelético. Identificadas también recientemente en el músculo esquelético adulto, los estudios más significativos son aquellos que muestran que estas células tienen capacidad de diferenciación, y de proliferación, y que poseen un perfil genético similar a las poblaciones de células madre indiferenciadas pluripotenciales aisladas de médula ósea (Jiang y cols., 2002 a y b).

Células satélite:

Son las mejor caracterizadas (Partridge, 2002), aunque su origen embrionario todavía no se conoce con exactitud. Podrían derivar de precursores somáticos, de células precursoras de mioblastos embrionarios e incluso de otros tipos celulares que han mostrado “*in vivo*” capacidad de regeneración muscular, tal es el caso de los mesoangioblastos, que son células madre asociadas a los vasos sanguíneos (De Angelis y cols., 1999; Minasi y cols., 2002; Sampaolesi y cols., 2003), de las células madre nerviosas (Galli y cols., 2000) y de las células derivadas de la médula ósea (Ferrari y cols., 1998; LaBarge y Blau, 2002).

Aparecen hacia el final de la embriogénesis y serán la fuente primaria de células miogénicas requeridas para el crecimiento postnatal del músculo (Bischoff, 1994).

Son células indiferenciadas asociadas a la fibra muscular que se sitúan por debajo de la lámina basal del músculo esquelético y por encima de la membrana plasmática o sarcolema de la célula muscular. Identificadas por primera vez en el año 1961 por Mauro, en músculos de las extremidades de la rana mediante microscopía electrónica, fueron identificadas más tarde en todos los vertebrados superiores. En humanos, estas células no fibrilares y mononucleares, constituyen un 32% de los núcleos sublaminares en el momento del nacimiento (Cardasis y Cooper, 1975), proporción que decrece con la edad, siendo tan sólo del 2 al 5% en el músculo adulto (Asakura y cols., 2002). Este hecho explicaría la disminución de la regeneración muscular en sujetos de mayor edad (Renault y cols., 2002). La frecuencia de las células satélite, también varía en relación con la función oxidativa de la fibra muscular, según ésta sea de oxidación lenta, rápida o rápida glicolítica, de tal forma que las de oxidación lenta poseen mayor número de células satélite que las de oxidación rápida.

En el músculo maduro las células satélite, permanecen mitoticamente quiescentes y se activan para proliferar y mediar el crecimiento postnatal o la regeneración muscular (Seale y Rudnicki, 2000). La progenie de las células satélite activadas denominada *precursores miogénicos*, regenera suficiente número de mioblastos para la diferenciación muscular en miocitos y la formación de los miotúbulos, aunque en el músculo viejo, este evento se reduce en favor de una tendencia a acumular grasa, lo que supone un deterioro en la capacidad de regeneración (Peterson, 1995; Taylor- Jones y cols., 2002).

La activación de las células satélite "*in vivo*" se origina tras el ejercicio físico (Snow, 1990), un daño agudo de la fibra muscular (Maltin y cols., 1983) o tras la denervación de ésta (Snow, 1983). Las situaciones de daño tisular, motivan su entrada en el ciclo celular para generar precursores miogénicos proliferantes, análogos a los mioblastos embrionarios. Paralelamente la respuesta inflamatoria generada por el sistema inmunitario, intenta restablecer las miofibras afectadas (Bischoff, 1994). En estas situaciones, los miembros de la familia Wnt se muestran sobreexpresados, lo que sugiere que existe paralelismo con los caminos de señalización miogénicos en el embrión. Adicionalmente la sobreexpresión de los genes *Myf-5* y *MyoD* que muestran las células satélite proliferantes en el lugar del daño, implica que las células que originen, estén destinadas hacia la línea miogénica (Eftimie y cols., 1991; Buonanno y

cols., 1992; Yablonka-Reuveni y Rivera, 1994; Cornelison y Wold, 1997; Beauchamp y cols., 2000). La expresión del factor Pax-7 disminuye con la sobreexpresión de los factores MRF4 y miogenina, y los miocitos diferenciados se fusionan a las fibras nuevas y a las ya existentes como parte del proceso reparativo. Ciclos repetidos de daño y reparación no parecen agotar las células satélite, lo que sugiere que poseen capacidad de autorrenovación (Bischoff, 1994).

Por todo ello, las células satélite se definen como SC con capacidad de autorrenovación, que originan precursores miogénicos en el músculo esquelético adulto, donde su función es el crecimiento postnatal y la regeneración (Asakura, 2003). Son multipotenciales, pudiendo diferenciarse además en otros tipos celulares como osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Asakura y cols., 2001; Wada y cols., 2002).

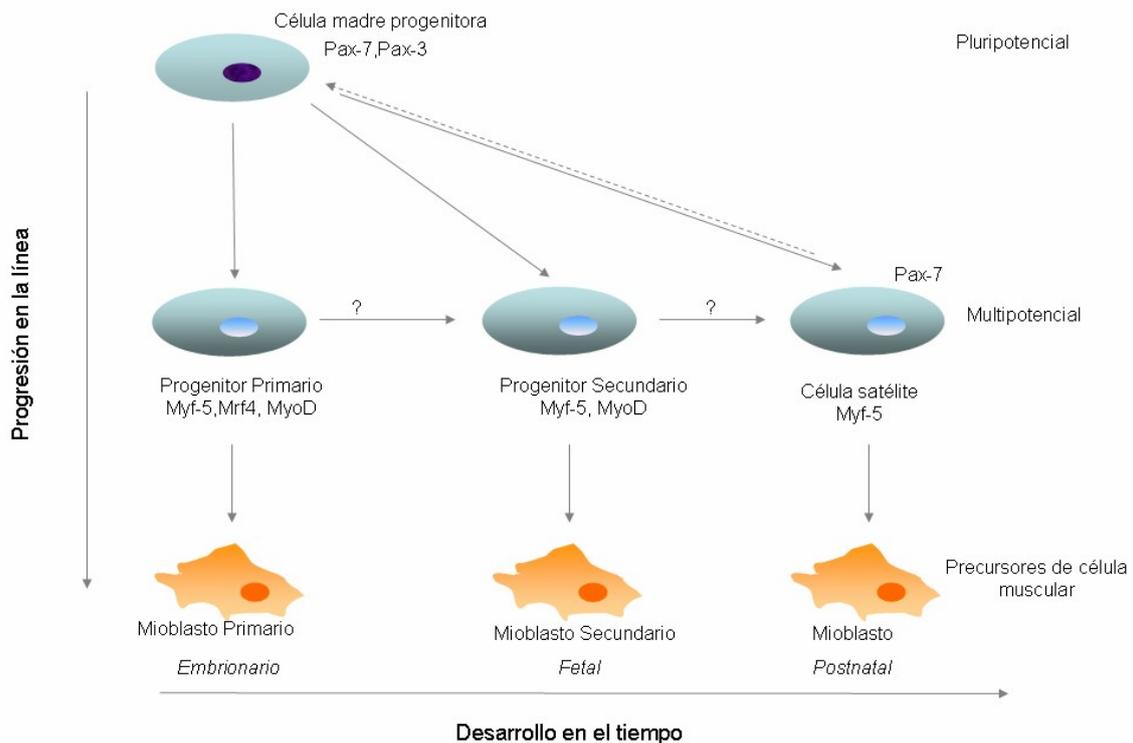


Fig. 1. Aparición de las distintas poblaciones de células madre durante la formación del tejido muscular. Peng y Huard (2004).

Hay tres entidades patológicas en las que en la actualidad, se investiga la aplicación de las MDSC como terapia celular: enfermedades que afectan al músculo esquelético, como la distrofia muscular de Duchenne (Deasy y Huard, 2002), que cursa

con debilidad y atrofia progresiva del tejido muscular. A pesar de los esfuerzos realizados, todavía no se han alcanzado los resultados deseados, debido a que la aplicación de esta terapia, presenta ciertas desventajas cuando se administra en los grupos musculares afectados. Entre las más importantes cabe señalar la migración limitada y la baja supervivencia de las células donantes implantadas en el músculo distrófico.

En ingeniería tisular ósea en base a su capacidad para diferenciarse a células de la línea osteogénica (Peng y Huard, 2004) (Fig.1). Por último, en reparación del cartílago articular donde se ha demostrado que pueden mejorar la curación del mismo de forma similar al trasplante de condrocitos (Adachi y cols., 2002).

Células madre de músculo asociadas a la vasculatura:

-Células mio-endoteliales progenitoras:

Se localizan fuera de la lámina basal, en los espacios intersticiales del músculo que coinciden con áreas ocupadas por los capilares que transcurren junto a las miofibras. Su baja proporción citoplasma-núcleo es característico de las células inmaduras. Poseen capacidad para diferenciarse hacia células endoteliales y fibras musculares esqueléticas tras su implante en el músculo (Tamaki y cols., 2002).

-Células madre vascular progenitoras:

En base a su capacidad para originar o no células sanguíneas, existen dos poblaciones diferentes de progenitores vasculares: la *población lateral* (side population, SP) y la *población no lateral* (no- side population, no-SP).

La población no-SP "*in vitro*" es adherente, tiene forma de huso característica y no origina células sanguíneas. Deriva de células madre de la médula ósea y posee progenitores celulares de fenotipo mesenquimal. Tras una lesión inducida en el tejido muscular, es capaz de regenerar las células musculares lisas de la túnica media de los vasos (Majka y cols., 2003).

La población SP es no adherente y se caracteriza "*in vitro*" por su forma redondeada y tamaño uniforme (Majka y cols., 2003). En función del perfil de marcadores de superficie se conocen dos subpoblaciones, una que puede diferenciarse en células hematopoyéticas, músculo esquelético y células satélite tras su trasplante "*in vivo*" y otra que sólo puede diferenciarse en células hematopoyéticas y musculares

(Asakura, 2003). Si se produce una lesión en el tejido muscular, la población SP es capaz de incorporarse al endotelio de los vasos de pequeño calibre y generar endotelio vascular (Majka y cols., 2003). Su origen no es del todo claro, aunque para algunos autores es una población que deriva de células madre de la médula ósea (Asakura, 2003) mientras que para otros, se correspondería con los pericitos asociados a la vasculatura del tejido muscular. El hecho de que existan células madre adultas en la mayoría de los tejidos, de que todas muestren plasticidad y de que casi todas puedan experimentar diferenciación hematopoyética, hace pensar que las diferentes poblaciones de células madre tisulares poseen un origen común que podría estar representado por los pericitos vasculares (Peng y Huard, 2004).

Los pericitos, fueron originalmente descritos como una población de células osteoprogenitoras por su participación en la reparación ósea después de una lesión (Díaz-Flores y cols., 1992) y por su capacidad de sufrir diferenciación hacia la línea osteogénica “*in vitro*” (Brighton y cols., 1992; Reilly y cols., 1998; Doherty y cols., 1998) e “*in vivo*” (Doherty y cols., 1998). En el músculo esquelético, las células madre y los pericitos que no expresan el marcador CD45, muestran diferenciación miogénica, pero si lo expresan, esta diferenciación disminuye en pro de un potencial hematopoyético elevado (Peng y Huard, 2004; McKinney-Freeman y cols., 2002), propiedad que también comparten otras poblaciones de SC aisladas de diversos órganos como el corazón, el cerebro, el hígado, el bazo, el riñón, el pulmón y el intestino delgado (Asakura y Rudniki, 2002).

Como podemos observar la presencia de células indiferenciadas con capacidad multilínea presentes en la mayoría de los tejidos son una opción importante como fuente celular en ingeniería tisular.

El interés de nuestro grupo de investigación desde hace más de 20 años, se centra en los procesos de lesión-reparación (Pascual y cols., 2004 a y b) y como a través de las técnicas de ingeniería tisular se pueden mejorar.

En esta memoria, hemos enfocado nuestro esfuerzo hacia los problemas de reparación cutánea de gran importancia clínica, estética y de elevados gastos sanitarios. La pérdida de la solución de continuidad por accidentes, traumatismos o enfermedades, cursa con una amplísima gama de situaciones clínicas. Desde importantes quemaduras incompatibles con la vida hasta lesiones que, si bien no son muy invalidantes, pueden dejar secuelas antiestéticas que cursan con graves alteraciones en la psiquis del paciente.

Por ello hemos de comenzar por recordar, como es *La PIEL*, nuestro órgano diana.

La piel constituye la capa límite exterior entre el ser humano y el medio ambiente. Con una superficie de aproximadamente 2m^2 , es el órgano más grande del cuerpo. Su espesor varía en las distintas regiones de la superficie corporal, desde tan solo 1mm a nivel del párpado hasta un espesor de 4 mm en la espalda.

Se clasifica en:

- Capa externa, *epidermis*
- Capa interna, *dermis*, la cual descansa y se ancla a la grasa subcutánea (hipodermis, pánículo adiposo) (Fig. 2).

También podemos diferenciar la *piel gruesa* (importante capa de queratina en palmas y plantas) del resto que se denomina *piel fina*.

- *Epidermis*

Deriva del ectodermo. Es un epitelio plano estratificado queratinizado, constituido principalmente por queratinocitos capaces de sintetizar queratina. En ella se distinguen desde el interior hacia la superficie, cinco estratos bien diferenciados:

Estrato basal o germinativo, consiste en una capa celular de una sola célula de espesor que se apoya sobre la lámina basal, formación extracelular que separa este epitelio del tejido conectivo de la dermis (Carrascal, 2001). La lámina basal se identifica fácilmente mediante la tinción ácida de Schiff y la positividad inmunohistoquímica para el colágeno IV.

El estrato basal contiene células madre pequeñas y cúbicas con una pequeña cantidad de citoplasma, por ello, los núcleos se sitúan muy juntos. Las células madre darán origen a los queratinocitos maduros por división mitótica, los cuales van migrando conforme se van diferenciando desde este estrato hacia el estrato más superficial o estrato córneo, donde terminarán descamándose de la superficie de la piel (Ross y cols., 2004). Este estrato es de basofilia pronunciada, debido a que los queratinocitos inmaduros poseen gran cantidad de ribosomas libres, en la mayoría de los cuales se lleva a cabo la síntesis de queratina. La queratina, es un filamento intermedio que cruza todo el citoplasma de la célula epitelial y a través de desmosomas se conecta con los filamentos de queratina de células vecinas. La unión de los queratinocitos a la lámina basal, es fundamental para mantener la integridad morfológica de la interfaz

epitelio-tejido conjuntivo dérmico, y se realiza mediante dos tipos de uniones adherentes, los hemidesmosomas y las adhesiones focales, que anclan respectivamente, los filamentos intermedios y los filamentos de actina del citoesqueleto a la membrana basal.

Estrato espinoso: consta de varias células de espesor, cuyo tamaño es mayor que el de las células del estrato basal. Su característica peculiar es que poseen múltiples proyecciones citoplasmáticas o “espinas”. La unión de estas proyecciones entre células contiguas se realiza mediante desmosomas. Debido a este aspecto, las células de este estrato se denominan espinocitos.

Los queratinocitos inmaduros penetran en este estrato, y continúan desplazándose hacia la superficie sintetizando filamentos de queratina. Cuando llegan a la parte más superficial, sus ribosomas libres comienzan a sintetizar gránulos de queratohialina y al mismo tiempo el aparato de Golgi comienza a secretar unas vesículas limitadas por membrana que reciben el nombre de cuerpos laminares. Además sintetizarán una mezcla heterogénea de glucoesfingolípidos, fosfolípidos y ceramidas.

Estrato granuloso: tiene de una a tres células de espesor que contienen abundantes gránulos de queratohialina de naturaleza basófila que se tiñen intensamente. Al igual que en el estrato espinoso, las células granulosas sintetizan la mezcla de glucoesfingolípidos, fosfolípidos y ceramidas. En este estrato, se lleva acabo la agrupación de los filamentos de queratina en haces más gruesos llamados tonofibrillas. La agrupación de los filamentos de queratina se produce por la presencia de dos proteínas, la filagrina y la trichohialina procedentes de los gránulos de queratohialina. Durante la queratinización las células granulosas pasarán a ser células cornificadas abandonando el estrato granuloso y penetrando en el estrato córneo.

La barrera epidérmica contra el agua se localiza entre el estrato granuloso y el estrato córneo. Se origina a expensas de los cuerpos laminares sintetizados en el estrato espinoso que liberan mediante exocitosis los glucoesfingolípidos, fosfolípidos y las ceramidas sintetizadas por las células espinosas y granulosas.

Estrato córneo: posee las células más diferenciadas de la epidermis. Tienen el núcleo y las organelas desintegradas, y la membrana plasmática engrosada. Son células cornificadas, que se van descamando y están ocupadas casi por completo de filamentos de queratina.

Estrato lúcido: localizado únicamente en la piel gruesa. Posee aspecto refráctil. Contiene células eosinófilas en avanzado estado de queratinización. El núcleo y las

organelas citoplasmáticas desaparecen conforme en la célula aumenta la presencia de queratina.

Otras poblaciones celulares incorporadas a la piel, enriquecen sus funciones

Dispersos entre los queratinocitos inmaduros, se encuentran otros tres tipos celulares: los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel.

Los melanocitos, derivan de células que durante la vida embrionaria migran desde la cresta neural y se introducen en la epidermis en desarrollo. La migración de los melanocitos hacia la epidermis, así como su supervivencia son dependientes tanto del receptor tirosin quinasa c-Kit como de su ligando el factor de célula madre o “*stem cell factor*” (Haake y cols., 2001).

El melanocito es una célula de aspecto dendrítico con un cuerpo celular redondeado que emite prolongaciones largas hasta los queratinocitos del estrato espinoso. En ambos estratos, basal y espinoso, se establece entre ambos tipos celulares una asociación funcional llamada unidad melanoepidérmica, caracterizada por la transferencia de melanina a los queratinocitos que se lleva a cabo mediante fagocitosis de la prolongación melanocítica por parte de los queratinocitos. La melanina además de ejercer una función protectora frente a los efectos nocivos de la radiación ultravioleta, ejerce otras funciones como son el control de la síntesis de vitamina D₃ y de la termorregulación local. Histológicamente puede identificarse mediante la tinción específica de plata de Masson-Fontana (McKee y cols., 2005).

Ultraestructuralmente los melanocitos poseen un citoplasma claro, y se observan como células desprovistas de tonofilamentos y desmosomas. Pueden ser además fácilmente reconocibles por la presencia de organelas citoplasmáticas específicas derivadas del retículo endoplásmico liso denominadas melanosomas, cuya función no se conoce con exactitud aunque se cree que representan a una variedad específica de lisosomas.

Las células de Langerhans tienen origen mesenquimático y derivan de células CD34 positivas de la médula ósea. Son células presentadoras de antígenos, que participan en reacciones de hipersensibilidad retardada a través de la captación de antígenos en la piel y su posterior transporte hacia los ganglios linfáticos.

Su morfología es dendrítica, pues se caracterizan por poseer prolongaciones que se extienden entre los queratinocitos vecinos. Su núcleo es de contorno irregular con típicas escotaduras que le confieren un aspecto lobulado, y poseen en el citoplasma unas características vesículas aplanadas en forma de raqueta de tenis, que ayudan a su

identificación ultraestructural. Se piensa que estas vesículas desempeñan un papel central en la presentación de antígenos en base al hecho de que aumentan en número cuando se suceden reacciones de sensibilidad por contacto.

Ultraestructuralmente se diferencian de los queratinocitos por su ausencia de desmosomas y tonofilamentos, y aunque pueden de manera ocasional presentar melanosomas asociados, nunca presentan ni melanosomas aislados ni premelanosomas en el interior de su citoplasma.

Estas células, se encuentran tanto en las capas suprabasales de la epidermis como en la dermis, aunque son difíciles de identificar con exactitud mediante técnicas histológicas convencionales, por lo que será necesario emplear reacciones supravitales como el azul de metileno, reacciones enzimáticas que utilicen adenosín trifosfato, o técnicas inmunohistoquímicas específicas. Las células de Langerhans, expresan gran número de antígenos de células leucocitarias y macrofágicas entre los que se incluyen el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (HLA-A, B, C), el de clase II (HLA-D), CD1a, CD1b, CD18 (integrina β_2), CD29 (integrina β_1), CD 45 (CLA), Lag y el receptor Fc-IgG II.

En estado activado expresan el receptor Ig-Fc, el receptor interleuquina-2 (CD25) y CD4. También expresan la proteína S-100, vimentina, E-cadherina y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (Cruz, 2001; Udey, 1997). En secciones tisulares de piel humana, el marcador específico de células de Langerhans es el anticuerpo anti-CD1a (Hauser y cols., 1991).

Ejecutan además la primera respuesta celular intraepidérmica frente a los antígenos tumorales y los microorganismos, desempeñando también un papel destacado en el rechazo de los injertos de piel (McKee y cols., 2005).

Tras ser estimuladas por los antígenos, migran a la zona paracortical del nódulo linfático bajo la influencia del TNF- α y la integrina α_6 , estimulando a los linfocitos T (Cumberbatch y Kimber, 1992; Price y cols., 1997; Haake y cols., 2001). Se piensa que los linfocitos T activados, regresarían más tarde a la epidermis para llevar a efecto la reacción inmune antígeno específica (Hauser y cols., 1991).

Las células de Merkel (CM) participan en la percepción sensorial cutánea. En combinación con fibras nerviosas mielínicas aferentes forman parte de mecanorreceptores sensoriales, estando fundamentalmente implicadas en las sensaciones de tacto (Tachibana, 1995; Munger, 1991).

El origen de la CM es aún desconocido. Podría derivar de la cresta neural, o bien de las células epidérmicas. Las dos hipótesis acerca de su origen están ligadas a su ambivalencia. La CM tiene características de célula neuroendocrina (granulos secretores densos), siendo conocidas por muchos como derivadas de las crestas neurales, pero también muestra caracteres de célula epitelial (expresión de filamentos intermedios de queratina, los desmosomas y proteínas desmosómicas).

La primera hipótesis, considera que la célula de Merkel es un derivado de la cresta neural capaz de migrar a la epidermis siguiendo el trayecto de los nervios periféricos. Esta teoría se basa en un acoplamiento entre la CM y los nervios no mielinizados de la dermis del feto y en algunos casos, en la migración a través de la membrana basal. Otros hechos apoyan esta teoría. Las células de Merkel se encuentran libres (presumiblemente en migración) en la dermis del feto joven. Existe parecido morfológico e histológico entre las distintas células conocidas derivadas de la cresta neural. La CM pues tendría una naturaleza neuroendocrina.

La segunda hipótesis, se apoya en estudios histoquímicos acerca del desarrollo de la CM en el feto humano que sugieren que tiene un origen epidérmico. Es muy discutida la existencia de un acoplamiento entre la CM y los nervios. Las células de Merkel se desarrollan en la epidermis antes de aparecer en la dermis, derivarían de células epiteliales y migrarían de la epidermis hacia la dermis. Asimismo aparecen en la epidermis del feto aunque no existan nervios en la dermis superficial. También se ha observado que pueden desarrollarse en una epidermis extraída en una edad fetal precoz (octava y undécima semanas) e injertada en un ratón timectomizado, incluso si su relación con los nervios dérmicos se interrumpe tras su extracción.

La CM expresa citoqueratinas 8, 18 y 19, características de los epitelios simples. Sin embargo, ello no es suficiente para poder probar su origen epidérmico. Una célula puede expresar filamentos intermedios de tipos diferentes a lo largo de su desarrollo. Algunas especies de mamíferos, muestran células morfológicamente intermedias entre los queratinocitos y las células de Merkel. Estos datos pueden sugerir un precursor común o una diferenciación de los queratinocitos en CM.

Las células de Merkel de piel humana expresan neuropéptidos como la sinaptofisina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), y el polipéptido gen-relativo calcitonina (CGRP). Contienen además proteínas específicas de neuronas como la enolasa neuronal específica (NSE) y la proteína producto del gen 9.5 (PGP) (McKee y cols., 2005). También expresan algunas proteínas desmosómicas, la molécula de

adhesión celular membranosa neural y el receptor para factor de crecimiento nervioso (Gallego y cols., 1995; Narisawa y cols., 1992). Asimismo muestran positividad para las citoqueratinas 8, 18, 19 y 20, características de de epitelios simples y de la epidermis fetal y además de estos marcadores, muestran una reacción positiva para la uranafina (McKee y cols., 2005). La reacción citoquímica uranafina permite la localización de nucleótidos de adenina, coloreándose específicamente los gránulos neurosecretores del sistema neuroendocrino, debido a las fuertes concentraciones de AMP, ADP o ATP.

Ultraestructuralmente, la CM presenta una morfología ovalada de eje mayor paralelo a la superficie cutánea. Se presentan expansiones vellositarias entre los queratinocitos adyacentes a los que está unida por desmosomas. El citoplasma es, habitualmente, más claro que los queratinocitos debido a la pobreza de la célula en filamentos intermedios. Los filamentos intermedios se distribuyen en el citoplasma, concentrados en la región perinuclear. El núcleo es ovalado, el eje grande se orienta en el sentido de la célula y es polilobulado. Las mitocondrias, los lisosomas y a veces, las vacuolas autofagocitarias aparecen en pequeño número. El retículo endoplásmico es rugoso encontrándose también, muchos ribosomas libres.

- *Dermis*

Deriva del mesodermo. Situada por debajo de la epidermis, se compone de tejido conjuntivo denso que proporciona sostén mecánico, espesor y resistencia a la piel. La estirpe celular que predomina en este estrato es la fibroblástica, que sintetiza tropocolágeno, fibras de reticulina (colágeno III) y fibras elásticas que proporcionan elasticidad a la piel. Posee además macrófagos, mastocitos, linfocitos, y miofibroblastos. Se divide en dos regiones diferenciadas:

Dermis papilar: ubicada justo debajo de la epidermis, se compone de tejido conjuntivo laxo con colágenos de tipo I y III principalmente, y de finas fibras elásticas organizadas en una red irregular. Posee vasos sanguíneos pertenecientes al *plexo subpapilar* (Kierszenbaum, 2002), que se extienden hacia arriba para irrigar la epidermis pero sin penetrar en ella (ya que ésta es un tejido avascular). Presenta además, prolongaciones nerviosas que terminan en la dermis o que alcanzan la epidermis penetrando a través de la lámina basal.

En el límite entre las dos capas dérmicas se encuentra un grupo de vasos sanguíneos correspondientes al *plexo cutáneo* (Kierszenbaum, 2002).

Dermis reticular: Es la más profunda, siendo de mayor espesor. Se compone de tejido conjuntivo denso, de colágeno tipo I mayoritariamente, y de fibras elásticas, que son algo más gruesas que en el estrato anterior. El colágeno y las fibras elásticas se organizan en líneas regulares de tensión.

La unión entre epidermis y dermis es de contorno irregular. La epidermis, posee estructuras digitiformes que se introducen en la dermis, denominadas crestas epidérmicas interpapilares y la dermis posee, protusiones de tejido conjuntivo o papilas dérmicas, entre las crestas epidérmicas.

El componente tisular conectivo fibroso de la piel (colágeno y fibras elásticas), se encuentra inmerso en la sustancia básica amorfa. Desarrollaremos estos componentes a continuación:

El Colágeno

Forma el almacén extracelular de todos los organismos pluricelulares. Es una proteína compleja sintetizada por una amplia diversidad de tipos celulares entre los que se incluyen los fibroblastos, miofibroblastos, osteoblastos, condroblastos, células musculares lisas, células endoteliales y varios tipos de células epiteliales (Wenstrup y cols., 1991). Se conocen al menos 20 tipos antigénicamente diferentes (Kadler y cols., 1996), designados como los tipos I-XX en función de su morfología, composición aminoacídica y de sus propiedades físicas.

Para su síntesis se requieren de alrededor de unas 20 enzimas específicas. La molécula básica del colágeno, es el tropocolágeno (con un peso molecular de aproximadamente 300,000 daltons), compuesta de tres cadenas α (de unos 1000 aminoácidos) de alrededor de 95,000 daltons cada una. Cada cadena α es una hélice de sentido levógiro, aunque las tres cadenas se intercalan en torno a un eje central para formar una triple hélice dextrógira. Cada tercer aminoácido de la cadena, es una molécula de glicina excepto en los extremos de la misma. Una hidroxiprolina o una hidroxilisina con frecuencia preceden a cada glicina, y una prolina a menudo sigue a cada glicina de la cadena. Junto a la prolina y la hidroxiprolina, la glicina es indispensable para la conformación de la triple hélice. En asociación con la hélice, hay grupos sacáridos que están unidos a residuos hidroxilisílicos, por ello el colágeno se clasifica con propiedad como una glucoproteína.

La formación de fibras colágenas se desarrolla en dos etapas, una intracelular y otra extracelular. En la primera etapa se combinan intracelularmente en organelas limitadas por membrana, los aminoácidos característicos del colágeno, (glicina, prolina/hidroxiprolina y un tercer aminoácido), para formar una triple hélice de procolágeno. Conforme es secretado por la célula, el procolágeno es convertido en una molécula de colágeno por el enzima procolágeno peptidasa asociada con la membrana celular, que escinde los extremos no helicoidales de la molécula. Las moléculas de colágeno aglomeradas, se alinean para formar las fibrillas colágenas definitivas produciéndose la oxidación de ciertos residuos de lisina e hidroxilisina, lo que favorece la aparición de entrecruzamientos entre las cadenas α de las moléculas próximas, lo cual ayuda a que se forme y consolide la característica arquitectura del colágeno. Los enlaces entrecruzados, son el principal factor que favorece la resistencia a la tensión del colágeno (Cotran y cols., 2000), la formación de enlaces covalentes dependen en parte del enzima lisil-oxidasa (McKee y cols., 2005).

La molécula de colágeno tiene una morfología alargada y mide aproximadamente 1.5 x 300 nm. Las secciones longitudinales de colágeno examinadas a microscopía electrónica, muestran estriaciones con una periodicidad de 64 nm. Estas estriaciones, se deben al solapamiento longitudinal de las moléculas de colágeno individuales, que ocurren durante el asentamiento de la fibra madura (McKee y cols., 2005).

Componente elástico

Las fibras elásticas son en esencia las responsables de las propiedades retráctiles de la piel (Uitto, 1991a) y únicamente son un componente minoritario en la dermis normal (2-4%). Son sintetizadas por los fibroblastos y también por las células musculares lisas. Están íntimamente asociadas con el colágeno, pero no pueden distinguirse mediante tinciones histológicas convencionales, siendo necesarias otras como la tinción de Orceina o de van-Gieson.

En la dermis papilar las fibras elásticas son finas y tienden a situarse perpendiculares a la superficie de la piel, mientras que en la dermis reticular son más gruesas y se suelen orientar de modo paralelo a dicha superficie.

A microscopía electrónica, se observa que las fibras elásticas se componen de microfibrillas de aproximadamente 11nm de diámetro, embebidas en una sustancia

electrodensa amorfa de naturaleza proteica conocida con el nombre de elastina (Christiano y cols., 1992), la cual es un polipéptido de 800 aminoácidos con un peso de aproximadamente 72,000 daltons.

La elastina está formada de un “armazón” de moléculas de fibrilina de la que se conocen tres tipos diferentes. La fibrilina es una proteína de alto peso molecular rica en cisteína y que también posee regiones de factor de crecimiento epidérmico de particular importancia por su capacidad de unión al calcio (Uitto y cols., 1991b; Goetinck y Winterbottom, 1991). La elastina posee entre otros aminoácidos desmosina e isodesmosina, que ayudan a mantener la integridad estructural de las fibras elásticas debido a su participación en enlaces covalentes. Durante la síntesis de la fibra elástica se forma primero el componente microfibrilar, que después será embebido en la elastina.

La sustancia básica amorfa

Constituye el medio en el que se encuentran los componentes celulares y fibrosos de la piel. Pero sus funciones más importantes se centran en el transporte de agua y electrolitos así como en otras de permeabilidad y osmolaridad de los fluidos intersticiales.

Se compone mayoritariamente de fibronectina y glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, condroitín sulfato 4 y dermatán sulfato), (Goetinck y Winterbottom, 1991) que son sintetizados por los fibroblastos de la piel y posiblemente por las células musculares lisas y los mastocitos.

Para su detección son necesarias técnicas de tinción con colorantes catiónicos, como el azul alcian a pH adecuado.

- *Hipodermis*

Es la capa más interna de la piel. Está compuesta por lóbulos de adipocitos, separados por tabiques fibrosos formados por colágeno y vasos sanguíneos de gran calibre, pertenecientes al *plexo subcutáneo* (Kierszenbaum, 2002), que proceden de la fascia profunda y ascienden a través de la grasa subcutánea. Almacena energía y cumple una función aislante. El contenido en tejido adiposo depende de las condiciones de nutrición y de cada región específica de la piel.

Vascularización

Las arterias que irrigan la piel proceden de grandes troncos arteriales. Desde una arteria subfascial, aparecen vasos primarios que irrigan la piel directamente a través de otros de diámetro menor, que circulan paralelos a la superficie cutánea. Emergiendo de la fascia profunda y generalmente atravesando el músculo, existen otros vasos indirectos, numerosos y de pequeño tamaño, que también irrigan la piel.

Inervación cutánea

La piel posee terminaciones periféricas de nervios sensitivos, que presentan diversas clases de receptores:

Mecanorreceptores, los cuales permiten la percepción de las sensaciones de deformación mecánica del tejido (tales como contacto, estiramiento, presión, vibración) y de sensaciones de propiocepción, como posición y movimientos del cuerpo. Los más sencillos están en la epidermis, siendo sus terminaciones nerviosas libres, ya que carecen de cubierta conjuntiva. En ocasiones, las terminaciones nerviosas se encuentran encapsuladas por tejido conjuntivo, a este grupo pertenecen los corpúsculos de Paccini, corpúsculos de Ruffini y corpúsculos de Meissner. Los corpúsculos de Pacini son de forma ovoide y de gran tamaño, se localizan en la dermis profunda y en la hipodermis y actúan como receptores de presión profunda además de responder a estímulos de vibración transitorios. Los corpusculos de Meissner se localizan en las papilas dérmicas debajo de la lámina basal de la epidermis y funcionan como receptores táctiles (Kierszenbaum, 2002).

Termorreceptores, para las sensaciones de frío y calor.

Nociceptores, para responder a estímulos de dolor.

La piel además está inervada con terminaciones nerviosas motoras para los vasos sanguíneos, los músculos erectores del pelo y las glándulas sudoríparas.

Anexos cutáneos

Folículos pilosos: constituyen junto a las glándulas sebáceas, la unidad pilosebácea propia de los mamíferos. El pelo es una estructura constituida por células queratinizadas firmemente unidas entre sí. Crece en las invaginaciones dérmicas, que se implantan profundamente en la dermis y tiene función protectora.

Glándulas sudoríparas: tienen diversas funciones: regulan el equilibrio térmico del organismo y producen secreción ácida que limita el crecimiento bacteriano.

Glándulas sebáceas: se sitúan junto al folículo piloso en el que desembocan. Su secreción esta compuesta por lípidos y restos celulares.

Uñas o formaciones epidérmicas córneas.

Funciones de la piel

Como cobertura externa corporal, posee funciones de vital importancia para la supervivencia. Sus dos capas de tejidos tienen cometidos específicos, aunque como órgano, la piel trabaja como un todo. La epidermis gracias a la queratina, representa una barrera física de protección frente a la entrada de agentes nocivos como bacterias y toxinas que además, impide la evaporación de agua en exceso. Recientemente Niyonsaba y cols. 2005, han descrito la presencia de agentes antimicrobianos que constituyen el escudo químico natural protector de la piel, tales como β -defensina, catelicidina LL-37 y lisozima. La melanina sintetizada por los melanocitos, protege nuestro organismo de los efectos nocivos de los rayos ultravioleta y las células de Langerhans constituyen una defensa inmunológica. La dermis, aporta protección frente a agresiones del medio externo, debido a la presencia de tejido conjuntivo y de fibras elásticas que confieren resistencia y elasticidad a la piel, y es capaz de regular el flujo sanguíneo con el fin de controlar la temperatura corporal y contribuir al equilibrio hidroelectrolítico. La presencia de diversos receptores cutáneos, confiere a este órgano función neurosensorial, permitiendo la percepción de sensaciones variadas provenientes del medio externo. La función metabólica de la piel, se debe a que en ella se deposita la grasa y se sintetiza vitamina D, constituyendo además una vía de eliminación de algunos fármacos.

Reparación-Regeneración de la piel

Para poder soportar las continuas agresiones que si bien no son muy severas, son continuas, la piel a nivel de la epidermis, posee su propio sistema de autorrenovación programada representado funcionalmente por cuatro compartimentos: el compartimento de *células madre*, el de *las células aceleradoras de tránsito*, células en *estado de diferenciación* y células *terminalmente diferenciadas* (Janes y cols., 2002).

El nicho que albergaría la población de células madre, así como la fuente de las mismas en la capa externa de la piel o epidermis ha sido siempre motivo de controversia entre los distintos autores. Si bien el folículo piloso, representa la principal fuente de células madre de la piel en estado de regeneración tras sufrir una lesión, existen evidencias suficientes para apoyar el concepto que señala la existencia de subpoblaciones de células madre epidérmicas no localizadas en los folículos pilosos implicadas también en la reparación de la piel, y que intervendrían con un papel destacado en la regeneración de la piel lampiña, donde por definición el vello está ausente.

Los estudios de cinética celular han demostrado la existencia de tres poblaciones celulares en el estrato basal de la epidermis: las *células madre*, las *células aceleradoras de tránsito* (que sólo permanecen en este estrato hasta que se transforman en células comprometidas hacia la línea epidérmica) y las propias *células comprometidas* que tras dividirse ascienden rápidamente desde este estrato experimentando la diferenciación terminal en queratinocitos (Potten y Morris, 1988).

- Las *células madre* o células indiferenciadas, tienen capacidad ilimitada de división, fenómeno que experimentan con lentitud denominándose por ello “*slow-cycling stem cells*” (Lavker y Sun, 2000). Pueden ser identificadas “*in vivo*” por su capacidad de retención de ^3H - timidina a largo plazo y por la elevada expresión de integrinas β -1 y α -6 que contrasta con la baja expresión del receptor de la transferrina (Janes y cols., 2002; Jones y cols., 1995a). Estas células poseen un extraordinario potencial de proliferación ya que gracias a ellas, la epidermis se renueva cada dos semanas durante toda la vida (Fuchs, 2001).
- Las *células aceleradoras de tránsito*, poseen un potencial mitótico limitado a tan sólo 4 o 5 divisiones antes de transformarse en células terminalmente diferenciadas.
- Las *células comprometidas*, que ya han perdido irreversiblemente la capacidad de dividirse e inevitablemente progresan hacia la línea queratinocítica, muestran pérdida de expresión de integrina α 6 β 4 y expresión de queratina 1.

Sin embargo cuando el daño es severo y se afecta la integridad de la piel como órgano vital, es necesario recurrir a un mecanismo universal reparador denominado

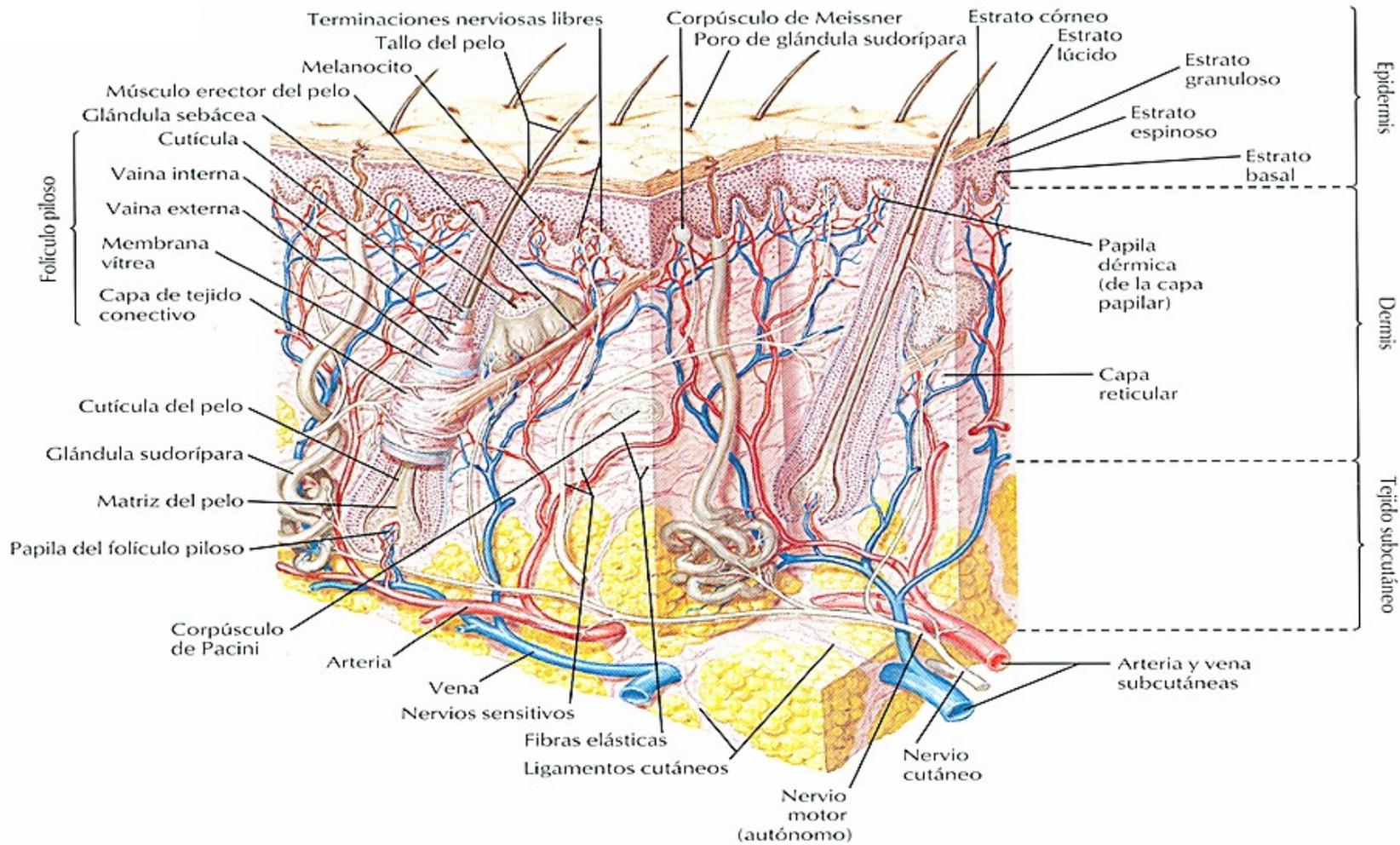


Fig. 2. Sección transversal de la piel. Tomado de L.R. Cochard (2005)

Cicatrización

Fenómeno biológico que comprende varios procesos perfectamente ensamblados y ordenados. Desde el mismo momento en que se produce la agresión a un tejido, se activa una cascada de señales moleculares que dan lugar a una secuencia concatenada de procesos que integran las siguientes fases: inflamatoria, proliferativa y reparadora, y de remodelación (Clark, 1996).

Hay un considerable intervalo de tiempo en la sucesión de todas estas fases, que hasta completar todo el proceso se puede prolongar varios meses (Bennet y Schultz, 1993b).

Fase inflamatoria

La inflamación representa la reacción de defensa del organismo ante la acción de un agente nocivo. Todas las heridas presentan reacciones inflamatorias. Su duración es aproximadamente de tres días (Hartmann, 1999).

El primer objetivo de los procesos reparativos es el de detener la hemorragia. Al producirse una lesión, desde las células dañadas se liberan sustancias vasoactivas que provocan una constricción de los vasos (vasoconstricción) evitando una mayor pérdida de sangre. El sistema de coagulación se activa a través del complejo proceso de aglomeración de trombocitos, para de ese modo cerrar de manera permanente el lugar de la lesión. Así se origina un coágulo que detiene la hemorragia, cierra la herida y la protege de posibles contaminaciones bacterianas y de la pérdida de humores. Además sirve de reservorio de citocinas y factores de crecimiento (FC) que son liberados en la degranulación plaquetaria (Zimmerman y cols., 2000). Este “cocktail” precoz de FC constituye el inicio de los procesos de cierre de la herida: proporciona señales quimiotácticas para reclutar células inflamatorias circulantes hacia la zona de la herida, inicia los movimientos tisulares de *reepitelización* y *contracción* del tejido conectivo, y estimula la característica respuesta angiogénica de la herida (Martin, 1997).

Las arteriolas, que se constriñeron brevemente en el momento de producirse la lesión, se dilatan por medio de la acción de sustancias vasoactivas como la histamina, la serotonina y la quinina, produciéndose una intensa irrigación sanguínea en la zona de la herida y un aumento de la permeabilidad vascular con un aumento de la exudación de plasma sanguíneo en el intersticio.

Entre dos y cuatro horas después de que se produzca la herida, se inicia la migración de leucocitos hasta la región tisular dañada, para fagocitar restos tisulares,

además de material y gérmenes exógenos. Esta migración es un fenómeno complejo que envuelve procesos de reconocimiento celular, a través de moléculas específicas de adhesión (selectinas, integrinas, etc.).

El número de neutrófilos alcanza un pico a las 24 horas y entonces cae gradualmente, cesando la infiltración de neutrófilos en unos pocos días, siendo los neutrófilos utilizados en fases previas fagocitados por macrófagos tisulares (Martin, 1997).

Transcurridas 24 horas se produce la migración de los monocitos a la región de la herida reclutados desde la circulación sanguínea, que se transforman en macrófagos en la zona de la lesión, alcanzando su pico a las 48 horas después de producirse la herida. Los macrófagos ocupan un papel central en la cicatrización, de hecho, ésta no sería posible sin su participación. Si la infiltración de macrófagos es impedida, la cicatrización es severamente dañada (Leibovich y Ross, 1975). Los macrófagos liberan una batería de citocinas/FC en la herida, esenciales para la reparación, que amplifican las señales previas liberadas por la degranulación plaquetaria y los neutrófilos (Martin, 1997), que a su vez estimulan y controlan la deposición de proteínas de la matriz, la angiogénesis y la reepitelización (Slavin, 1996).

Fase proliferativa

En esta fase, que comienza aproximadamente al cuarto día, predomina la proliferación celular con el fin de alcanzar la reconstitución vascular y de volver a rellenar la zona defectuosa mediante el tejido granular. Los FC liberados por los macrófagos estimulan la migración de fibroblastos, células epiteliales y células del endotelio vascular ilesas de los márgenes de la herida (Grant y cols., 1992; Grant y cols., 1987); a su vez, estas células proliferan, aumentando la celularidad de la herida, e iniciando la fase proliferativa, que a menudo dura varias semanas (Hartmann, 1999).

A partir de cuarto día comienza a rellenarse la zona de la lesión de un nuevo tejido, denominado tejido de de granulación. Su formación es iniciada, principalmente por fibroblastos, que producen por una parte colágeno y por otra proteoglicanos (macromoléculas de matriz extracelular).

La región central de una herida es hipóxica. La reparación de la herida no puede progresar sin nuevos vasos (Hartmann, 1999). Gracias a los FC, los vasos intactos del borde de la herida generan brotes vasculares que migran a la zona lesionada y al coágulo sanguíneo colindante (Risau, 1997; Clark y cols., 1996; Fisher y cols., 1994).

Fase de diferenciación y remodelación

Entre el 6° y 10° día comienza la maduración de las fibras de colágeno. La herida se contrae, se reduce cada vez más la presencia vascular y el contenido de agua en el tejido granular, que gana en consistencia, y se transforma finalmente en el tejido cicatricial. La epitelización cierra el proceso de curación de la herida (Hartmann, 1999).

El metabolismo del colágeno dentro de la herida es un equilibrio entre síntesis y degradación (Slavin, 1996). Diversos FC como el PDGF, el FGF, y algunas citocinas (IL-1, TNF- α) inducen la secreción de metaloproteinasas (MMPs) por parte de fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, y algunas células epiteliales, que degradan el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. Una vez formadas, las MMPs son inhibidas rápidamente por sus inhibidores tisulares (TIMPs). El resultado final de los procesos de síntesis y degradación es la remodelación (Goetzl, 1996). La retracción de las fibras colágenas sólo desempeña un papel secundario en la contracción de la herida. Los fibroblastos del tejido de granulación tienen una intervención mucho más decisiva en la contracción, ya que una vez finalizan sus actividades de secreción se transforman en parte en fibrocitos (estado de reposo) y en parte en miofibroblastos, que al igual que las células musculares lisas contienen actomiosina, proteína muscular con capacidad para generar fuerzas contráctiles (Clark, 1996; Desmoulière y cols., 1993; Berry y cols., 1998).

Del tejido granular parten las señales quimiotácticas, (KGF), que actúan sobre los queratinocitos para que se inicie la migración de las células epiteliales desde los bordes de la herida (Nanney, 1990), además, proporciona una superficie húmeda deslizante para que lleven a cabo su migración. La reepitelización se origina a partir de los apéndices de epidermis residual y de los epitelios de los márgenes laterales de la herida (Hartmann, 1999; Garlick y Taichman, 1994; Kidd y cols., 1971). Las uniones de hemidesmosomas tienen que ser disueltas, y los primeros queratinocitos de los bordes de la herida tienen que expresar nuevas integrinas, en orden a alcanzar un sostén sobre la matriz provisional de la herida y desplazarse sobre la dermis subyacente a ella (Breuss y cols., 1995; Haapasalmi y cols., 1996; Grinnell, 1992).

Cuando la superficie desnuda de la herida ha sido cubierta por una monocapa de queratinocitos, la migración epidérmica cesa, y una nueva epidermis estratificada con una membrana basal subyacente es reestablecida desde los márgenes internos de la herida (Clark, 1996).

Por el modo de evolución, podemos establecer dos grupos fundamentales de heridas: *Heridas agudas*, que son lesiones discretas que vienen seguidas de una fase de cicatrización relativamente rápida; y *heridas crónicas*, que se desarrollan durante un largo periodo de tiempo (usualmente no inferior a dos meses) y que se caracterizan por un significativo retraso en el proceso cicatrizal (Saulis y Mustoe, 2001).

Modelos experimentales de cicatrización

A pesar de ser la cicatrización un mecanismo universal, cada proceso, al mismo tiempo es modulado por tantos factores o variables que lo convierten en un hecho singular. A nivel cutáneo, los modelos experimentales con animales han sido cruciales en el avance obtenido en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la cicatrización de heridas. Múltiples estudios en animales han revolucionado nuestra percepción en este campo. La siguiente clasificación (Saulis y Mustoe, 2001) no incluye todos los modelos de cicatrización de heridas existentes, pero sí aquellos que han sido más relevantes.

Modelos de heridas agudas

Hay tres tipos principales:

- *heridas incisas, similares a las heridas quirúrgicas,*
- *heridas excisionales de espesor parcial o total (en el que se integrará nuestro modelo) y*
- *heridas por quemaduras.*

Los modelos excisionales son más incómodos de reproducir que los incisionales, ya que en ellos hay que conseguir una cuidadosa preservación del área de la lesión mientras se prolongue su reparación.

Modelos de cicatrización retrasada

Los modelos con demora en su cicatrización principalmente empleados son:

- *heridas isquémicas,*
- *heridas en animales envejecidos,*
- *heridas crónicas, y*
- *heridas de úlceras por presión.*

Modelos en animales inmunodeprimidos

Hay cuatro grupos esenciales:

- *heridas en animales diabéticos,*
- *heridas inducidas por la radiación,*

- *heridas en animales tratados por esteroides, y*
- *heridas en animales tratados con inmunodepresores.*

Modelos con cuerpos extraños

Entre ellos encontramos los modelos tipo:

“wound chambers” (espacio muerto cubierto por cubiertas deslizables),

modelos de espacio muerto (como los implantes porosos que permiten el crecimiento del tejido de granulación dentro de ellos a través de los poros, y así se puede estudiar este tejido, separado de otros procesos como la epitelización y la contracción de la herida (Saulis y Mustoe, 2001, y

modelos que utilizan de forma provisional cuerpos extraños que actúan como sistemas de liberación de principios activos que posteriormente se degradan hasta desaparecer por completo del medio tisular.

Otros

Además de los modelos descritos en los últimos años, han surgido otros nuevos que han revolucionado con nuevas perspectivas el tratamiento de los procesos de reparación entre ellos destacan sobre todo y de forma muy reciente los que implica las técnicas de ingeniería tisular en todas sus acepciones, tanto como terapia guiada, constructos (piel artificial) ó células madre (Llames y cols., 2006; Jiménez y Jiménez, 2004), y es hacia estos modelos hacia donde se dirige nuestra atención en esta memoria.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Un amplio abanico de enfermedades y/o de estados fisiológicos, influyen de forma negativa sobre la reparación de heridas de la piel, lo cual conlleva en muchos casos con la formación de una cicatriz antiestética y retráctil. Por ello, conseguir una reparación rápida y eficaz que permita integrar sin gran demora al paciente a su estado funcional previo en individuos afectados con determinadas patologías, sigue siendo una encrucijada sin resolver en la práctica médica.

Una de las alternativas más novedosas, es la “Terapia Celular”. Es decir la utilización de células como tratamiento médico, para la reparación /regeneración de las lesiones de la piel. Este tipo de terapia permitirá colocar las bases celulares necesarias para restaurar la solución de continuidad deseada con mayor rapidez y eficacia.

El desarrollo de esta alternativa terapéutica, se ha encontrado con la necesidad de buscar fuentes celulares como herramienta de tratamiento. Esto ha llevado a desarrollar nuevas estrategias que ayuden a conseguirlas.

La aplicación clínica de células madre ha suscitado gran interés en multitud de disciplinas médicas (Conrad y Huss, 2005), y con resultados todavía no concluyentes en algunas de las aplicaciones más precoces en clínica como la reparación cardiaca.

En el caso de las lesiones cutáneas, la modulación de la homeostasis local mediante la administración de células madre pluripotenciales podría tener un impacto significativo en la práctica médica (Thomas y Harding, 2002). El intento previo de obtención de células madre derivadas epidérmicas con bajas tasas de epitelización y estabilización de la cicatriz en grandes quemados (Llames, 2004), nos animó a buscar como fuente alternativa las células madre derivadas de músculo que habían sido utilizadas en otras terapias como cardiaca (Menaschè, 2003) y regeneración de músculo esquelético (Herreros y cols., 2003), pero nunca antes en tejido epidérmico es decir en la cicatrización de las heridas, no hemos encontrado hasta la fecha, trabajos que estimulen la reparación de las mismas con MDSC. A nivel conceptual la administración de SC para estimular la reparación de defectos cutáneos, presenta un enorme potencial por sus atractivas propiedades terapéuticas.

Todos los conceptos que previamente hemos desarrollado animaron a nuestro grupo a plantearnos la siguiente *Hipótesis* de trabajo.

¿Son las células madre derivadas de músculo una alternativa eficaz para la reparación de defectos cutáneos excisionales?

Para verificar esta hipótesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- 1. Aislamiento, caracterización y optimización del momento para el trasplante de las MDSC*
- 2. Aplicación de las MDSC como terapia celular sobre un modelo experimental de defecto excisional cutáneo*

O.1 PRIMER OBJETIVO

Aislamiento, caracterización y elección del momento para el transplante de las MDSC

En este primer objetivo nos propusimos diseñar un protocolo de obtención de células madre musculares, observar su comportamiento en cultivo, realizar su caracterización mediante diferentes técnicas y elegir el momento en el cual estas células podrían presentar las condiciones óptimas para su utilización como terapia celular en nuestro modelo.

El tejido elegido fue el tejido muscular esquelético. Se utilizaron 20 conejos blancos de Nueva Zelanda con un peso de $3.305 \pm 274,32$ kg a los que se les tomó una biopsia del músculo dorsal, para la obtención de las DMSC. Como población control se utilizará siempre la población obtenida a partir de fibroblastos cutáneos del mismo animal experimental.

O.1.1 MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de medios de cultivo

Minimal Essential Medium (M.E.M)

Se diluyen 9,39 g de M.E.M (Gibco) en 1 l de agua ultrapura; se añaden 2,2 g de bicarbonato sódico (NaHCO_3) y se filtra a través de un filtro de $0,22\mu\text{m}$ de porosidad (Stericup®, Millipore). A continuación se alicuota el medio en frascos de cristal de 100 ml y se suplementa con 1 ml de antibiótico-antimicótico (Gibco): 10000 U/ml de penicilina G sódica, 10000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina sulfato y 25 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B. Se guarda a 4°C.

Amniomax

Se mezclan 450 ml de medio basal AMNIOMAX-C100 (1X) (Gibco), con 75 ml de suplemento AMNIOMAX-C100 (Gibco) y 5 ml de antibiótico-antimicótico (Gibco). Se guarda a 4°C.

Preparación de enzimas

Se han utilizado dos enzimas proteolíticas: *colagenasa Tipo I* (Gibco) y *tripsina/EDTA* (Gibco).

Colagenasa

Se reconstituyen 100 mg de colagenasa tipo I en 100 ml de M.E.M. y se añaden 1,5 ml de cloruro cálcico (CaCl_2) 1M. Una vez reconstituida, se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0,20 μm de porosidad (Acrodisc®, Pall Gelman Laboratory). Se almacena a -20°C en alícuotas de 10 ml hasta su utilización.

Tripsina

A 90 ml de agua destilada estéril se le añaden 10 ml de Hank's Buffer Saline Solution (HBSS) 10X (libre de Calcio y Magnesio) (Gibco), se mezcla bien, se retiran 10 ml de esta solución y se añaden otros 10 ml de tripsina-EDTA 10X (Gibco). Así conseguiremos obtener tripsina-EDTA 1X.

Obtención de células madre derivadas de músculo

Las células madre derivadas de músculo se obtuvieron a partir de una biopsia de 1g de músculo dorsal de conejos blancos de Nueva Zelanda (Fig.4a). Para ello los animales fueron anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (70 mg/kg), diazepam (1.5 mg/kg) y clorpromazina (1.5 mg/kg), administrada por vía intramuscular. Seguidamente, se practicó una pequeña incisión cutánea paravertebral, obteniendo un fragmento de músculo dorsal. La incisión se cerró con ágrafes metálicos.

Inmediatamente después, el tejido muscular fue sumergido en 25 ml de MEM. completo y transportado al laboratorio para su procesamiento en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar Telstar AV 30/70 (Müller 220 V 50 MHz).

A continuación, se procedió a disgregar mecánicamente la biopsia muscular, con ayuda de dos hojas de bisturí (Fig.4 b y c). Los pequeños fragmentos, se recogieron con una pipeta de cristal, se lavaron con M.E.M. y se centrifugaron a 1050 rpm durante 5 minutos. Tras la retirada del sobrenadante, se realizó la primera digestión enzimática incubando el pellet resultante con 10 ml de colagenasa tipo I al 1% durante 1 h a 37°C

(Fig. 5a). Transcurrido este tiempo, se añadieron 20 ml de M.E.M. para eliminar los restos de colagenasa y se centrifugó a 1050 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue desechado, y se llevó a cabo la segunda digestión enzimática, resuspendiendo el precipitado en 10 ml de tripsina 1X (Fig.5b) durante 40 minutos en un baño de agua a 37°C en agitación.

La acción de la tripsina se neutralizó añadiendo 10 ml de suero bovino fetal (Gibco). La suspensión celular se filtró a través de una malla de 100 μm (Fig. 5c) y se centrifugó a 1050 rpm durante 5 minutos.

Se decantó y el precipitado fue resuspendido en 20 ml de M.E.M para eliminar las impurezas. Este proceso se repitió 3 veces.

Finalizado el proceso de lavado, el pellet fue resuspendido y puesto en cultivo en 2 ml de Amniomax (Gibco) en un frasco de 25 cm^2 (Fig. 6) (Falcon Williams Dr. Oxnard U.S.A) a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 en una estufa de incubación Forma Scientific (Hucoa-Erlös S.A). El esquema de todo el proceso, se detalla en la Fig. 3.

Los frascos de cultivo se dejaron reposar durante los tres primeros días. Pasado este tiempo, se renovó el medio de cultivo dos veces por semana, hasta alcanzar una monocapa confluyente, momento en el que se realizó el *subcultivo celular*.

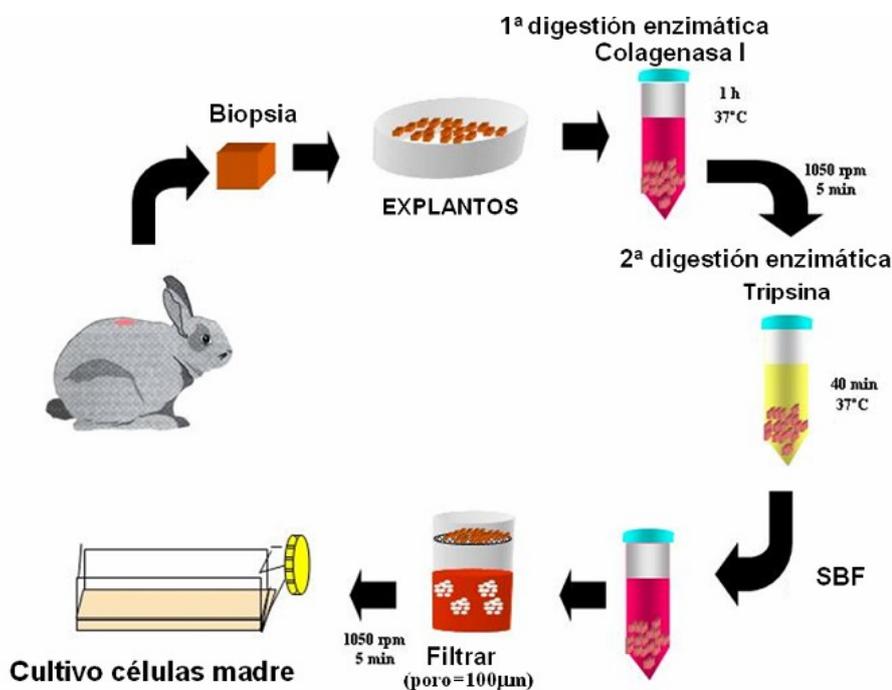


Fig. 3. Esquema de obtención de un cultivo de células madre procedentes de músculo esquelético.

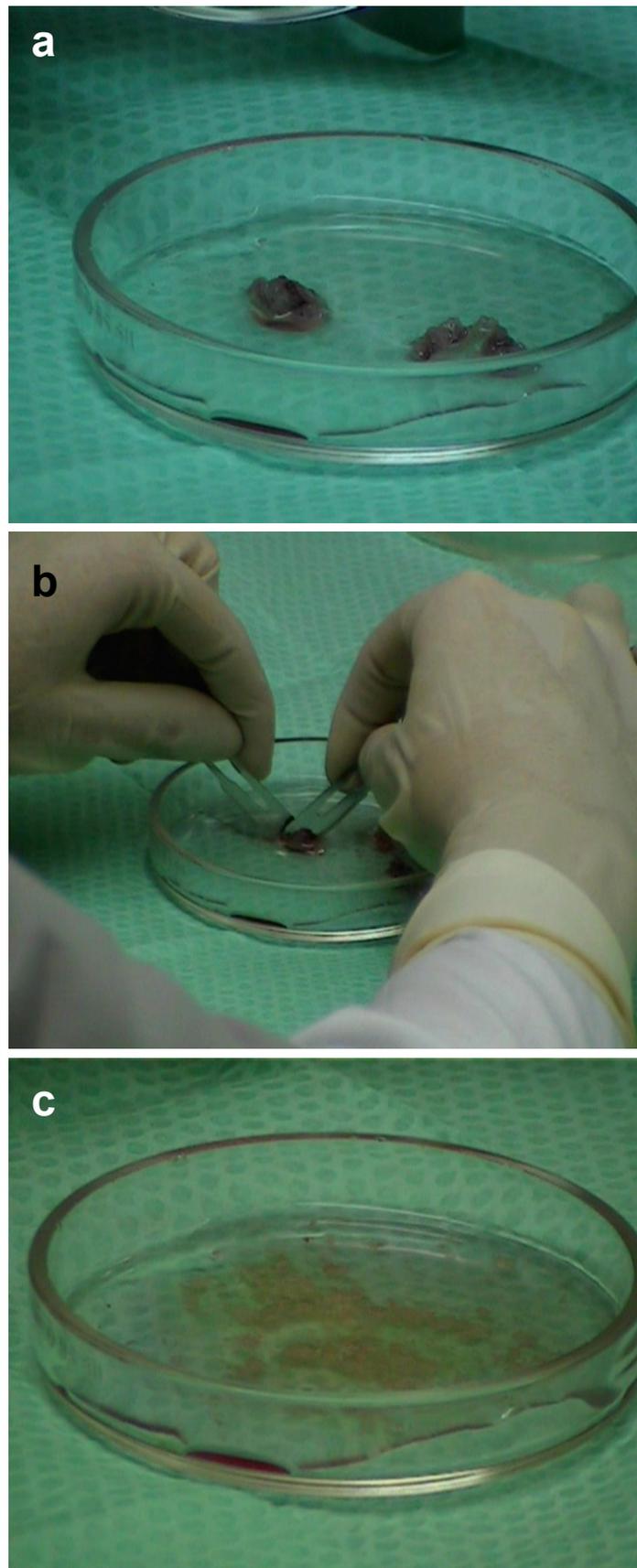


Fig. 4. a) Biopsia de músculo esquelético.
b) Disgregación mecánica de la misma.
c) Pequeños fragmentos del tejido.

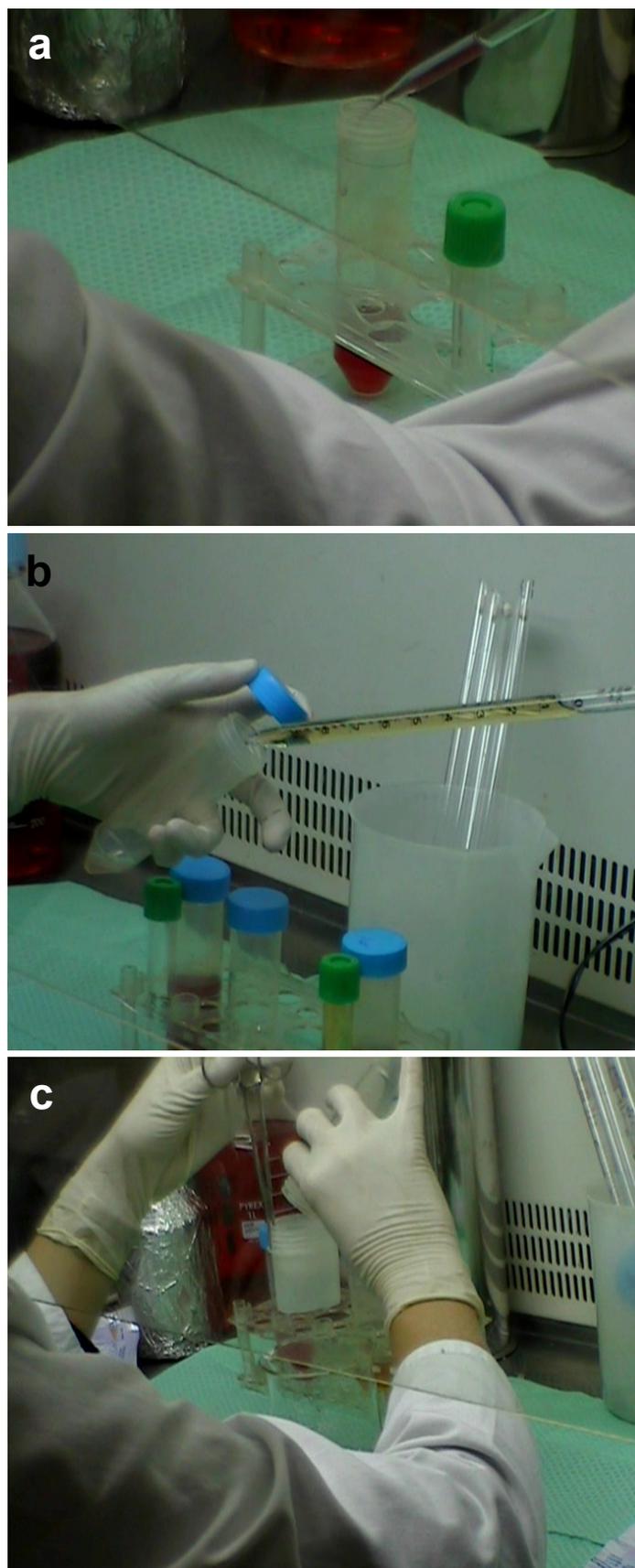


Fig. 5. a) Adición de colagenasa tipo I, b) Adición de tripsina, c) Filtrado de la suspensión celular a través de una maya de 100 μm .

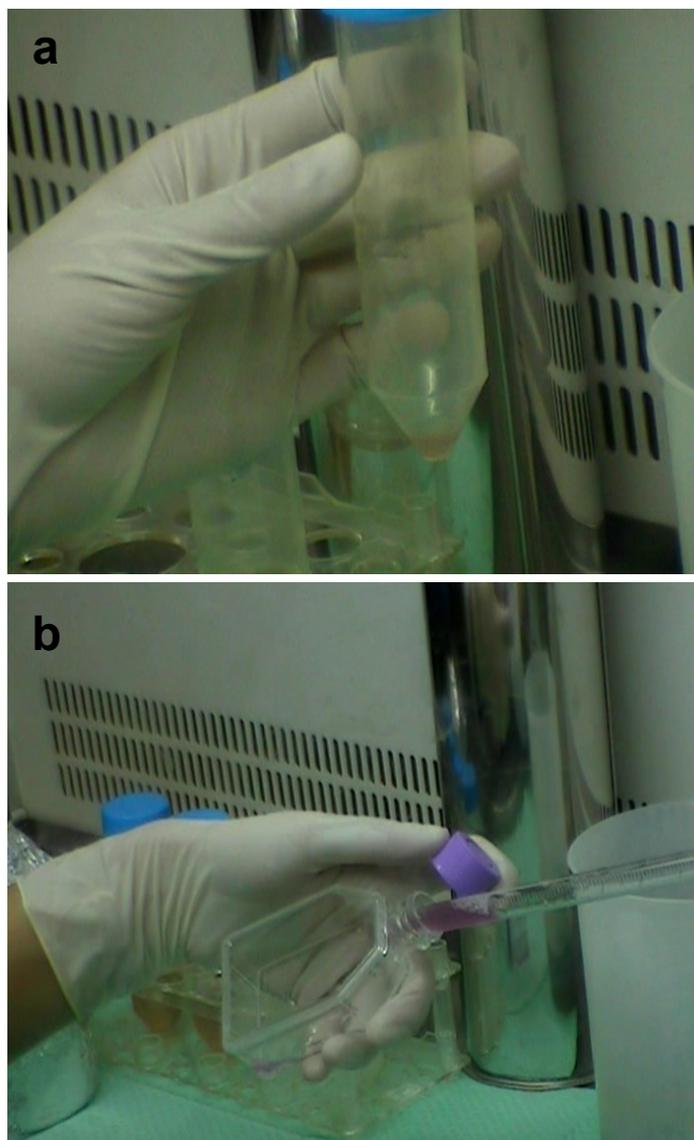


Fig. 6. a) Precipitado obtenido al término del proceso de extracción de células madre de músculo. b) Traspase de dicho precipitado en frasco de cultivo de 25 cm².

Obtención de fibroblastos

Los fibroblastos fueron obtenidos a partir de muestras de piel tomadas en el lugar de incisión cutánea de los animales a los que se extrajo la biopsia muscular. El tejido fue sumergido en M.E.M. completo y transportado al laboratorio.

En condiciones de esterilidad, la dermis fue cuidadosamente separada de la epidermis mediante dos hojas de bisturí y se procesó, realizando pequeños explantos sobre una placa Petri. Con ayuda de una pipeta Pasteur se recogieron y depositaron en la cara de cultivo de un frasco de 25 cm² que previamente fue humedecida con 0,5 ml de Amniomax. El frasco de cultivo se situó en posición vertical durante 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se colocó en posición horizontal y se añadió una cantidad de medio suficiente como para permitir que los explantos permaneciesen correctamente sumergidos y adheridos a la superficie de cultivo, sin desprenderse.

El medio se renovó dos veces por semana hasta que las células alcanzaron la confluencia y se realizó el *subcultivo celular*.

Subcultivo celular

Independientemente de la estirpe celular, la técnica seguida para la realización de los subcultivos fue similar. Una vez formada la monocapa celular en el frasco de cultivo, se retiró el medio, se añadieron 1,5 ml de tripsina/EDTA 1X y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de actuación del enzima, se disgregaron los acúmulos celulares mediante pipeteado evitando, en la medida de lo posible, la formación de espuma. A continuación, se añadieron 3,5 ml de Amniomax con el fin de detener la reacción enzimática por acción de las proteínas presentes en el medio y seguidamente, se dividió la suspensión celular en dos nuevos frascos de cultivo o en cubreobjetos estériles de vidrio que se emplearon para las distintas técnicas.

| | |
|--------------|-------------|
| Acetona 70° | 30 minutos. |
| Acetona 90° | 30 minutos. |
| Acetona 100° | 30 minutos. |

Las muestras así deshidratadas se conservaron en Acetona de 100° hasta ser llevadas a un POLARON E-3000 (Polaron Ltd, England), donde se desecaron hasta alcanzar la deshidratación total (punto crítico). Posteriormente fueron montadas en platinas de aluminio para scanning de 0,5 pulgadas, siendo adheridas a las mismas mediante cinta adhesiva de doble cara. Por último, se metalizaron con oro paladio y se estudiaron en un microscopio electrónico de barrido ZEISS DSM-950 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

- **Microscopía electrónica de transmisión**

La inclusión para la microscopía electrónica de transmisión lleva consigo los siguientes pasos:

- Primer día:

Post-fijación de las piezas en tetróxido de osmio al 1% en tampón Millonig con calcio durante una hora.

* Lavado rápido en agua destilada.

Deshidratación de las piezas en acetonas:

| | |
|----------------|-------------|
| Acetona al 30% | 15 minutos. |
| Acetona al 50% | 30 minutos. |
| Acetona al 70% | 30 minutos. |

Acetato de uranilo a saturación toda la noche a 4°C.
en acetona al 70%

Segundo día:

Deshidratación e inclusión en Araldita:

| | |
|--|---|
| Acetona al 90% | 30 minutos en dos baños de 15 minutos cada uno. |
| Acetona al 100% | 30 minutos en dos baños de 15 minutos cada uno. |
| Sulfato de cobre a saturación en acetona al 100% | 45 minutos. |
| Óxido de propileno | 40 minutos en dos baños de 20 minutos cada uno. |
| Óxido de propileno /Araldita I (3:1) | 30 minutos. |
| Óxido de propileno/Araldita I (2:2) | 2 horas. |
| Araldita I | toda la noche en estufa a 37°C. |

- Tercer día

Inclusión y elaboración de los bloques:

| | |
|-------------|------------------------------|
| Araldita I | 1 hora en estufa a 37°C. |
| Araldita II | 30 minutos en estufa a 37°C. |
| Araldita II | 45 minutos en estufa a 37°C. |

* Llenado de cápsulas o moldes y polimerización a 70°C en estufa durante 48 horas.

Una vez obtenidos los bloques, se realizaron los cortes semifinos en un ultramicrotomo ULTRACUT REIGHERT-JUNG a una micra de espesor, y fueron teñidos con azul de Toluidina. Establecida la zona de estudio, se retalló la misma en una talladora TM 60 CREIGHERT, para posteriormente efectuar los cortes ultrafinos de 60 nanómetros. Estos cortes se recogieron en rejillas de cobre cubiertas con membrana de formvar y se contrastaron con citrato de plomo durante cuatro minutos; una vez lavados y secos se observaron en un microscopio electrónico de transmisión EM 109 (ZEISS).

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| Añadir SOLUCIÓN C | 5 ml |
| Añadir SOLUCIÓN D | 0,25 ml gota a gota y agitando. |

Preparación del ácido ósmico:

| | |
|-------------------|-------|
| Ácido ósmico | 0,1 g |
| Tampón con calcio | 10 ml |

* *TAMPÓN MILLONIG SIN GLUCOSA PARA LA PREPARACIÓN DEL GLUTARALDEHIDO AL 3%.*

| | |
|--------------------|--------|
| SOLUCIÓN A | 500 ml |
| SOLUCIÓN B | 100 ml |
| Glutaraldehído | 6 ml |
| Tampón sin glucosa | 44 ml |

* *ARALDITAS:*

Los elementos utilizados para la preparación de las diferentes aralditas empleadas, son los que se detallan a continuación:

ACY 212 - Araldita.

DDSA - Endurecedor.

DIBUTIL TALATO - Plastificante.

DMP-30 - Acelerador.

Preparación de la *ARALDITA I:*

| | |
|----------------|-------|
| ACY 212 | 10 ml |
| DDSA | 10 ml |
| Dibutil Talato | 1 ml |

Preparación de la *ARALDITA II*:

| | |
|----------------|--------|
| ACY 212 | 10 ml |
| DDSA | 10 ml |
| Dibutil Talato | 1 ml |
| DMP-30 | 0,3 ml |

Autorradiografía (proliferación celular)

La técnica se basa en la incorporación de ^3H -Timidina al núcleo de la célula proliferante durante la duplicación del ADN. Para determinar la capacidad proliferativa de las MDSC se sembraron 5×10^4 células sobre cubreobjetos estériles y se añadió 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina al medio de cultivo durante 24h, estudiando su evolución tras 14 días de cultivo. Como grupo control se utilizaron los fibroblastos.

Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 10 % y posteriormente se sometieron a técnicas autorradiográficas. Para ello se sumergieron los cubreobjetos en emulsión NTB-2 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA), diluida 1:1 en agua a 40°C. Seguidamente se almacenaron a 4°C en oscuridad durante 2 semanas.

A continuación, fueron revelados con D-19 (Kodak) durante 5 minutos en agitación y lavados brevemente en ácido acético al 0,5 % para detener el revelado. Posteriormente, se fijaron con Rapid Fix (Kodak) durante 5 minutos hasta obtener una película transparente, se lavaron en agua corriente durante 1 hora y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con hematoxilina de Carazzi durante 5 minutos y las preparaciones se montaron con plasdon.

Estudios inmunohistoquímicos

El material biológico utilizado fue:

a) Músculo dorsal control (para la identificación de las células madre “in situ”) procesado mediante técnicas de microscopía óptica, que se detallan a continuación.

b) Células madre derivadas de músculo de 5 y 14 días en cultivo y fibroblastos. Las células se sembraron en cubreobjetos estériles.

Los anticuerpos utilizados reflejados en la **tabla I.**, corresponden a marcadores de diferenciación miogénicos, marcadores de célula madre de músculo, moléculas de adhesión celular y citoqueratinas.

Se realizó inmunohistoquímica convencional (IC) o inmunofluorescencia (IF). La fijación y las técnicas inmunohistoquímicas empleadas para el tejido o las células que se detallan en la **tabla I.**, se optimizaron según el anticuerpo utilizado, y se desarrollan a continuación.

a) Procesamiento del tejido muscular: Técnicas de microscopía óptica

- **Fijación del tejido**

El tejido muscular se fijó, bien en congelación a -80°C introducido en un criotubo (Sterilin, U.K) o bien en líquido de Bouin (Panreac, Barcelona) durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fijadas en congelación a -80°C , se guardaron hasta su posterior inclusión, y las fijadas en líquido de Bouin, se lavaron con una disolución de etanol de 70% hasta la desaparición en el tejido del color amarillento que confiere el ácido pícrico del fijador. Se conservaron a 4°C en esta disolución hasta su inclusión.

- **Inclusión**

Inclusión en congelación

Las piezas fijadas en congelación se incluyeron a -20°C en Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound (Sakura, The Netherlands), utilizando moldes rectangulares de policloruro de vinilo.

| Anticuerpo | Tejido muscular | Células |
|----------------------------|---------------------------|---|
| Vimentina * | Congelación -80°C (IC) | Paraformaldehido 2% (10 min) (IF) |
| α -actina * | Congelación -80°C (IC) | Paraformaldehido 2% (10 min) (IF) |
| Desmina * | Bouin 1 h (IC) | Paraformaldehido 2% (10 min) (IF) |
| Miosina * | Congelación -80°C (IC) | Paraformaldehido 2% (10 min) (IF) |
| M-Cadherina ** | Bouin 1 h (IF) | Metanol (10 min) (IF) |
| CD-34 ** | Bouin 1 h (IF) | Metanol (10 min) (IF) |
| Myf-5 ** | Congelación -80°C (IC) | Congelación -80°C (IF) |
| Syndecan-4 *** | Congelación -80°C (IC) | Paraformaldehido 2% (10 min) (IF) |
| Integrina β 1 *** | Congelación -80°C (IC) | Paraformaldehido 2% (10 min) (IC) |
| Fibronectina *** | Bouin 1 h (IC) | Paraformaldehido 2% (10 min) (IC) |
| Citoqueratinas-10 y 14 | Congelación -80°C (IC) | Paraformaldehido 2% (10 min) (IC) |

Tabla I. Marcadores de diferenciación miogénicos (*), marcadores de células madre de músculo (**), moléculas de adhesión celular (***), y citoqueratinas.

Deshidratación e inclusión en parafina

Las muestras fijadas en líquido de Bouin, fueron deshidratadas e incluidas en parafina siguiendo la siguiente metodología:

| | |
|--|-----------------------|
| Alcohol 96° | 30 minutos |
| Alcohol 100° | 1 hora. (3 x 20 min). |
| Alcohol 100°/Acetato de n-butilo (1:1) | 30 minutos |
| Acetato de n-butilo | 1 hora. (3 x 20 min). |
| Acetato de n-butilo/parafina (*) | 30 minutos. |
| Parafina (*) | 3 horas. |

(*) Estos dos últimos pasos se realizaron en una estufa a 60°C.

Finalizado el tiempo en parafina, se procedió a la realización de los bloques. Para ello se utilizó parafina pura a 60°C, ésta fue vertida en un molde en el que se depositó a continuación la pieza, orientándola en la posición adecuada para proceder a su microtomía.

- **Procesamiento de los bloques**

Los bloques de congelación, se cortaron en un criostato LEICA CM 1850 a una temperatura de -20°C, en secciones de 5 µm de espesor recogidas en portaobjetos impregnados de una solución de polilisina al 10% en agua destilada. Los portaobjetos con las secciones de tejido, se guardaron a -20°C hasta la realización de las técnicas inmunohistoquímicas.

Los bloques de parafina, se cortaron con un microtomo MICROM HM 325, en secciones de 5 µm de espesor, se estiraron en un baño de agua caliente, se recogieron en portaobjetos impregnados con la solución de polilisina al 10% en agua destilada y se mantuvieron en una estufa a 37°C durante al menos una noche, para conseguir una buena adhesión de las muestras al vidrio. Tras este procedimiento, se realizaron las técnicas inmunohistoquímicas.

b) Procesamiento de las células

Las células sembradas en cubreobjetos fueron lavadas con PBS 1X, y fijadas en

todos los casos con una disolución de paraformaldehído al 2%, durante 15 minutos. Seguidamente, se realizaron tres lavados con PBS 1X, y se guardaron en este mismo tampón a 4°C hasta la realización de las técnicas inmunohistoquímicas.

Técnicas inmunohistoquímicas

- **Inmunohistoquímica convencional**

La técnica utilizada para detectar la reacción antígeno-anticuerpo fue la avidina-biotina marcada con fosfatasa alcalina. El marcaje fue estudiado con un microscopio óptico (ZEISS, Jena, Germany).

-Técnica:

- Lavado con PBS pH=7,4, tres lavados de 5 minutos cada uno.
- Bloqueo de sitios inespecíficos con 4% BSA (albúmina sérica bovina) en PBS pH=7,4, durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Anticuerpo primario diluido (según especificaciones de la casa comercial) en PBS-BSA 0,5% pH=7,4; durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
- Lavado con PBS-BSA 0.5% pH=7,4, tres lavados de 5 minutos cada uno.
- Anticuerpo secundario biotinado; diluido en PBS, durante 45 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS-BSA 0.5% pH=7,4, tres lavados de 5 minutos cada uno.
- Complejo Extreptavidina[®]-Fosfatasa alcalina (1:200), durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado en PBS, tres pases de 5 minutos
- Añadir el sustrato cromogénico e incubar 15 minutos (controlando bajo el microscopio)
- Lavar con agua destilada, tres pases de 5 minutos.
- Tinción de los núcleos celulares con hematoxilina de Carazzi.
- Montar en medio acuoso

La preparación del sustrato cromogénico se realizó de la siguiente forma:

10 mg α -naftol AS-BI fosfato

10 mg Fast red

100 μ l 0.1 M Levamisole

10 ml TRIS buffer

Se prepara inmediatamente antes del revelado, añadiendo 10 ml de buffer a los 10 mg de α -Naftol fosfato y se mezcla. A ésta solución se le añade 10 mg de Fast red y se mezcla con lo anterior. Se añaden 100 μ l de levamisole. Por último se filtra toda la mezcla para eliminar los precipitados y se añade inmediatamente sobre el tejido. Esta técnica permite obtener un marcaje en rojo intenso.

El revelado de las muestras se llevó a cabo durante 15 minutos en una estufa a 37°C.

Por último, los núcleos celulares se contrastaron durante cinco minutos con hematoxilina ácida.

Se utilizó como control negativo el mismo material biológico al que no se le había añadido anticuerpo primario, siendo éste sustituido por PBS.

- **Inmunofluorescencia**

La reacción antígeno-anticuerpo fue detectada utilizando un sistema de amplificación de la reacción (TSA TM Plus Fluorescence Systems; Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA), con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con cianina 3 (Cy 3).

-Técnica:

- Equilibrado de la muestra en PBS pH 7,4
- Inhibición de la peroxidasa endógena, con 0.3% H₂O₂ en Metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado en agua normal, dos pases de 5 minutos cada uno.
- Bloqueo de sitios inespecíficos con BSA 4% (albúmina sérica bovina) en PBS pH=7,4, durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Anticuerpo primario diluido (según especificaciones de la casa comercial: **Tabla II, Tabla III, Tabla IV, Tabla V**) en PBS-BSA 0,5% pH=7,4 durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.

- Lavado con PBS-BSA 0.5% pH=7,4, tres pases de 5 minutos cada uno.
- Anticuerpo secundario biotinado, durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS-BSA 0.5% pH=7,4, tres pases de 5 minutos cada uno.
- Complejo Extreptavidina[®]-HRP (1:600), durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Lavado con PBS pH=7.4, tres pases de 5 minutos cada uno.
- Incubar en la solución de amplificación con el fluoróforo (FITC/Cy3), (1:2000) durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Lavado con PBS pH=7.4, tres pases de 5 minutos cada uno.
- Tinción de los núcleos celulares con DAPI.
- Montaje con PBS pH=7.4/Glicerol (1:1).
- Se observan las preparaciones a microscopía de fluorescencia (Zeiss Axiophot) (ZEISS, Jena, Germany).

Se utilizó como control negativo el mismo material biológico al que no se le había añadido anticuerpo primario siendo este sustituido por solución tampón.

Tabla II. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica: Marcadores de diferenciación miogénicos:

| Anticuerpo (dilución empleada) | Especificidad | Subclase de Ig G | Proveedor |
|---|--|-------------------------|----------------------------------|
| Vimentina (1:40) | Mouse Monoclonal anti-Vimentin | Mouse Ig G 1 | Sigma , St. Louis, MO, U.S.A. |
| α -actina (1:400) | Mouse Monoclonal anti- α -Smooth Muscle Actin | Mouse Ig G 2a | Sigma , St. Louis, MO, U.S.A. |
| Desmina (1:20) | Mouse Monoclonal anti-Desmin | Mouse Ig G 1 | Sigma , St. Louis, MO, U.S.A. |
| Miosina (1:200) | Mouse Monoclonal anti-Myosin (smooth) | Mouse Ig G 1 | Sigma , St. Louis, MO, U.S.A. |

Tabla III. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica: Marcadores de células madre de músculo:

| Anticuerpo (dilución empleada) | Especificidad | Subclase de Ig G | Proveedor |
|---|--|-------------------------|---|
| M-Cadherina (1:75) | Goat Polyclonal anti-M Cadherin (N-19) | Goat Ig G | Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A |
| CD-34 (1:500) | Goat Polyclonal anti- CD34 (C-18) | Goat Ig G | Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A |
| Myf-5 (1:200) | Rabbit Polyclonal anti- Myf-5 (C-20) | Rabbit Ig G | Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A |

Tabla IV. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica: Moléculas de adhesión celular:

| Anticuerpo (dilución empleada) | Especificidad | Subclase de Ig G | Proveedor |
|---|---|-------------------------|---|
| Syndecan-4 (1:100) | Goat Polyclonal anti-Syndecan-4 (N-19) | Goat Ig G | Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A |
| Integrina β -1 (1:100) | Mouse Monoclonal anti- human Integrin β 1 | Mouse Ig G 1 | Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A |
| Fibronectina (1:200) | Mouse Monoclonal to cellular Fibronectin | Mouse Ig G | Abcam, CB, UK |

Tabla V. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica: Citoqueratinas:

| Anticuerpo (dilución empleada) | Especificidad | Subclase de Ig G | Proveedor |
|---|-------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Citoqueratina 10 | Mouse Monoclonal | Ig G 1 | Novo Castra, NE, UK |
| | anti-human Cytoqueratin 10 | | |
| Citoqueratina 14 | Mouse Monoclonal | Ig G 3 | Novo Castra, NE, UK |
| | anti-human Cytoqueratin 14 | | |

- **Cuantificación del marcaje**

Para los anticuerpos que se realizó cuantificación del marcaje, se tomaron sobre los cubreobjetos, 10 campos al azar y bajo el microscopio óptico y con el objetivo de 10x, se realizaron contajes de las células marcadas por dos observadores diferentes. Se calculó la media \pm SD de los mismos, utilizando el test de la U de Mann-Whitney. La significación estadística se estableció en * $p < 0.05$.

Inmunodetección de proteínas

a) Extracción de proteínas a partir de células en cultivo

Se emplearon:

- Fibroblastos.
- Células madre derivadas de músculo.

DISOLUCIONES:

| | |
|---------------------------------------|-------|
| -Na ₂ HPO ₄ | 0.5 M |
| -Urea | 8 M |
| -NONIDET NP-40 (Amresco, Ohio, U.S.A) | 10 % |

| | |
|--|-------|
| -Inhibidor de Proteasas (Roche, IN, U.S.A) | 25X |
| -EDTA | 0.2 M |

Se sembraron 200.000 células en frascos de 25 cm², cuando estuvieron confluentes, se procedió a la extracción de proteínas mediante lisis celular y posterior precipitando con ácido tricloroacético. Para ello, se retiró el medio de cultivo, y se lavaron las células con PBS 1X en condiciones de esterilidad. Seguidamente se añadieron 2 ml de tampón de extracción a cada frasco manteniéndose a 4°C en agitación durante 2 h.

| Tampón de extracción | | 2 ml |
|----------------------------------|-------|---------|
| Na ₂ HPO ₄ | 0.5 M | 64 µl |
| Urea | 8 M | 1500 µl |
| NP-40 | 10 % | 100µl |
| Inhibidor de proteasas | 25X | 80 µl |
| EDTA | 0.2 M | 50 µl |
| Agua | | 206 µl |

Transcurrido el tiempo de lisis, se añadieron 4 ml de tampón de dilución frío (4°C) a cada frasco de 25 cm².

| Tampón de dilución | | 4 ml |
|----------------------------------|------|---------|
| Na ₂ HPO ₄ | 0.5M | 128 µl |
| Inhibidor de proteasas | 25X | 160 µl |
| EDTA | 0.2M | 100µl |
| Agua | | 3612 µl |

El producto resultante de la lisis celular (6 ml) se recogió en tubos eppendorf, y se centrifugó en una ultracentrífuga EPPENDORF CENTRIFUGE 581012 R, a 15000 rpm, 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó para precipitar las proteínas en hielo durante 20 minutos con ácido tricloroacético 6.1 N (Sigma, St Louis, MO, U.S.A) a una concentración final del 10%. Seguidamente, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue desechado y se lavó el pellet en vortex con 300 µl de acetona fría (-20°C). Por último, se realizó una segunda centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, desechando el sobrenadante. Finalmente, los restos de acetona fueron eliminados de las proteínas ya precipitadas, por desecación en campana extractora.

El pellet de cada eppendorf fue diluido y homogeneizado en 1 ml de agua destilada, tomando de este volumen 20 µl para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). El volumen restante, fue centrifugado a 10000 rpm, 5 minutos a 4°C y el precipitado de proteínas obtenido, diluido en 40 µl de tampón de muestra 2X y almacenado a -20°C hasta la realización de los Western-Blot.

El tampón de muestras, se preparó con antelación y se guardó a -20°C hasta su utilización.

| Tampón de muestras 2X | |
|--------------------------|----------|
| Glicerol | 1 g |
| Tris base, 0.5 M, pH 6.8 | 2.5 ml |
| SDS 10 % | 5 ml |
| Azul de bromofenol | 0.05% |
| 2-mercaptoetanol | 40 µl/ml |
| Agua c.s.p | 10 ml |

b) Inmunodetección de proteínas

En los ensayos de inmunodetección de Western-Blot se han empleado:

- Agente de tinción para Bradford (Dye-reagent, Biorad, Munich, Alemania).
- Para preparar los minigeles:
 - Acrilamida 40 % y Bisacrilamida 1.5 %.
 - Tris base 0.5 M, pH 6.8 y Tris base 1.5 M, pH 8.8.
 - SDS 0.4 %, Persulfato amónico 100 mg/ml y Temed (Amresco, Ohio, U.S.A).
- Tampón de electroforesis 1X, preparado a partir del 5X con pH 8.5.

| Tampón de electroforesis | 5X | |
|--------------------------|--------|------|
| Tris base | 0.05 M | 6 g |
| Glicina | 0.4 M | 30 g |
| SDS | 0.1 % | 5 g |
| Agua | | 1 l |

Tampón de transferencia 1X, preparado a partir del 5X con pH 8.3.

| Tampón de transferencia | 5X | |
|-------------------------|--------|---------|
| Tris base | 130 mM | 15.75 g |
| Glicina | 192 mM | 14.41 g |
| Metanol | | 250 ml |
| SDS | 0.1 % | 5 g |
| Agua c.s.p | | 1 l |

- Marcadores de peso molecular (Biorad, Hercules, CA, U.S.A).
- Membranas de nitrocelulosa Bio Trace NT (Pall Gelman Sciences

Internacional).

- Kit Supersignal (Pierce, Rockford, IL, U.S.A) para quimioluminiscencia.
- Película autorradiográfica, X Omat Blue XB-1 (Kodak).
- Revelador y fijador Polymax (Kodak).

-Método:

- Se tomaron alícuotas de 20 μ l de proteína diluidas en tampón de muestra 2X, que se hirvieron durante 5 minutos para favorecer la expansión y apertura de la molécula proteica.
- Separación de las proteínas por electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida a temperatura ambiente durante 120 minutos a 100 V en condiciones reductoras.
- Transferencia durante 2 horas, a temperatura ambiente y 210 mA, a una membrana de nitrocelulosa.
- Tinción de la membrana con Rojo Ponceau 0.2% durante 3 minutos para observar la correcta transferencia.
- Lavado con ácido acético al 5%, 3 veces durante 1 minuto cada vez.
- Lavado con PBS 1X-Tween-20 0.05%, 2 veces, 1 minuto.
- Bloqueo de los sitios de unión inespecífica a la membrana, incubando con tampón PBS 1X-Tween-20 con leche desnatada en polvo 5%, toda la noche a 4°C.
- Lavado con PBS 1X-Tween-20 0.05%, 2 veces, 5 minutos.
- Incubar el anticuerpo primario diluido en el tampón de bloqueo (según especificaciones de la casa comercial: **Tabla VI**), dos horas a temperatura ambiente.
- Lavado de la membrana con PBS 1X-Tween-20 0.05%, 3 veces durante 5 minutos.
- Incubar con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido en PBS 1X-Tween-20 0.05%, 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS 1X-Tween-20 0.05% dos veces, 5 minutos.
- Lavado con PBS 1X 1 vez, 5 minutos.
- Revelado mediante quimioluminiscencia, incubando con luminol 5 minutos.
- Visualización de las bandas en película autorradiográfica.
- Revelado.

Tabla VI. Anticuerpos utilizados para Western-Blot:

| Anticuerpo (dilución empleada) | Especificidad | Subclase de Ig G | Proveedor |
|---|--|-------------------------|----------------------------------|
| Vimentina (1:1000) | Mouse Monoclonal anti-Vimentin | Mouse Ig G 1 | Sigma , St. Louis, MO, U.S.A. |
| α -actina (1:1000) | Mouse Monoclonal anti- α -Smooth Muscle Actin | Mouse Ig G 2a | Sigma , St. Louis, MO, U.S.A. |
| Desmina (1:500) | Mouse Monoclonal anti-Desmin | Mouse Ig G 1 | Sigma , St. Louis, MO, U.S.A. |
| Miosina (1:1000) | Mouse Monoclonal anti-Myosin (smooth) | Mouse Ig G 1 | Sigma , St. Louis, MO, U.S.A. |
| TGF β -1 (1:5000) | Goat anti-human LAP (TGF β -1) | Goat Ig G | R&D Systems Inc., MN, U.S.A. |

O.1.2. RESULTADOS

Estudios morfológicos

Las primeras células comienzan a observarse en el frasco de cultivo hacia el tercer día tras realizar el proceso de extracción. En torno al día quinto, presentan un aspecto pleomórfico con diferentes formas y tamaños (Fig. 7a). Esta población se va expandiendo y a los 14 días el número de células y su morfología han cambiado considerablemente.

A microscopía óptica, en el microscopio invertido, el aspecto predominante es el fibroblastoide (Fig. 7b). La microscopía electrónica, confirma la existencia de formas y tamaños muy diferentes pero con una característica común, la mayoría de las células presentaban un aspecto muy secretor (Fig. 8a). Se observaron amplias cisternas reticulares, presencia de cuerpos densos en el citoplasma y núcleos con nucleolos fácilmente identificables (Fig. 8b). Así mismo, se observaron en discreto número, células de la población no adherente sobre una monocapa uniforme de células subyacentes (Fig. 8c).

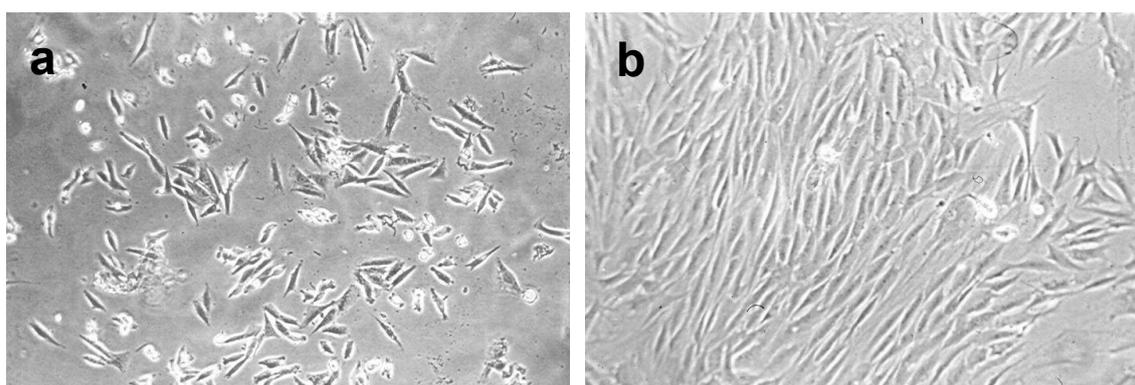


Fig. 7. Imágenes de las MDSC en cultivo. a) 5 días en cultivo (M.O. 100x). b) Dos semanas en cultivo, obsérvense algunas células refringentes en división (M.O.100x).

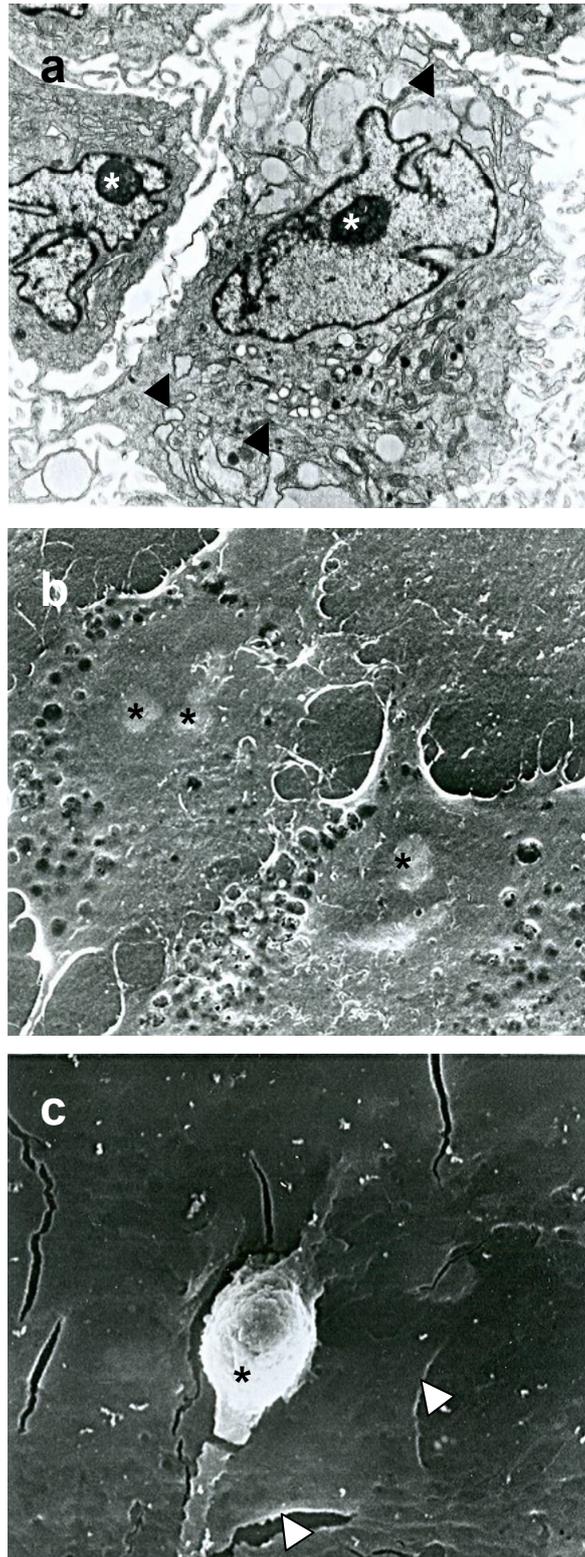


Fig. 8. Imágenes de microscopía electrónica. a) MDSC con un retículo altamente secretor (▲) (MET 4000x). b) Característicos núcleos con nucleolos (*) fácilmente identificables (MEB 2000x). c) Población celular no adherente (*) sobre una monocapa de células adherentes. (△) (MEB 2000x).

Proliferación celular

La capacidad proliferativa de las MDSC comparada con la población de fibroblastos control, fue estudiada mediante la incorporación de timidina tritiada. El porcentaje de células marcadas fue significativamente mayor en todos los tiempos de estudio para la población MDSC, comparado con la población control del mismo animal, y esta diferencia se mantuvo en la valoración global de ambas poblaciones (Fig. 9a). Observe la incorporación de timidina tritiada en los núcleos de las MDSC (Fig. 9b y c).

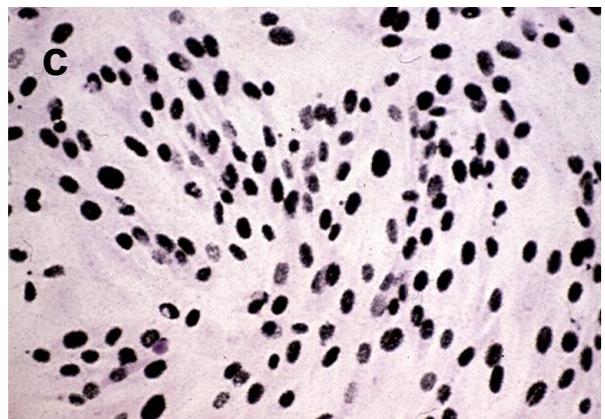
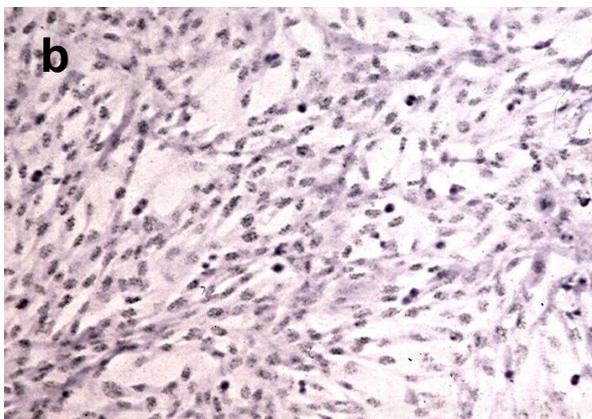
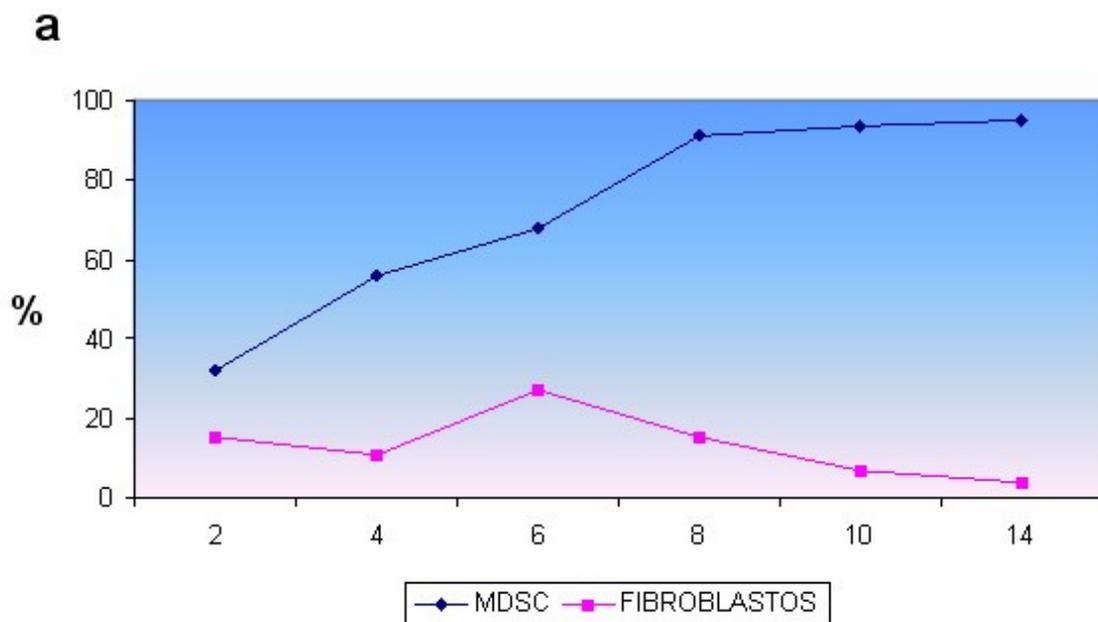


Fig. 9. Estudio de proliferación. a) MDSC vs fibroblastos. b) MDSC en cultivo mostrando mediante autorradiografía incorporación de ^3H -timidina en los núcleos de las células proliferantes a los 5 días (M.O. 100x) y c) a los 14 días (M.O. 200x).

Para comprobar la capacidad de autorrenovación de las MDSC, se mantuvo la población en cultivo a lo largo del tiempo, encontrándose en la actualidad en el 60 subcultivo (Fig. 10).

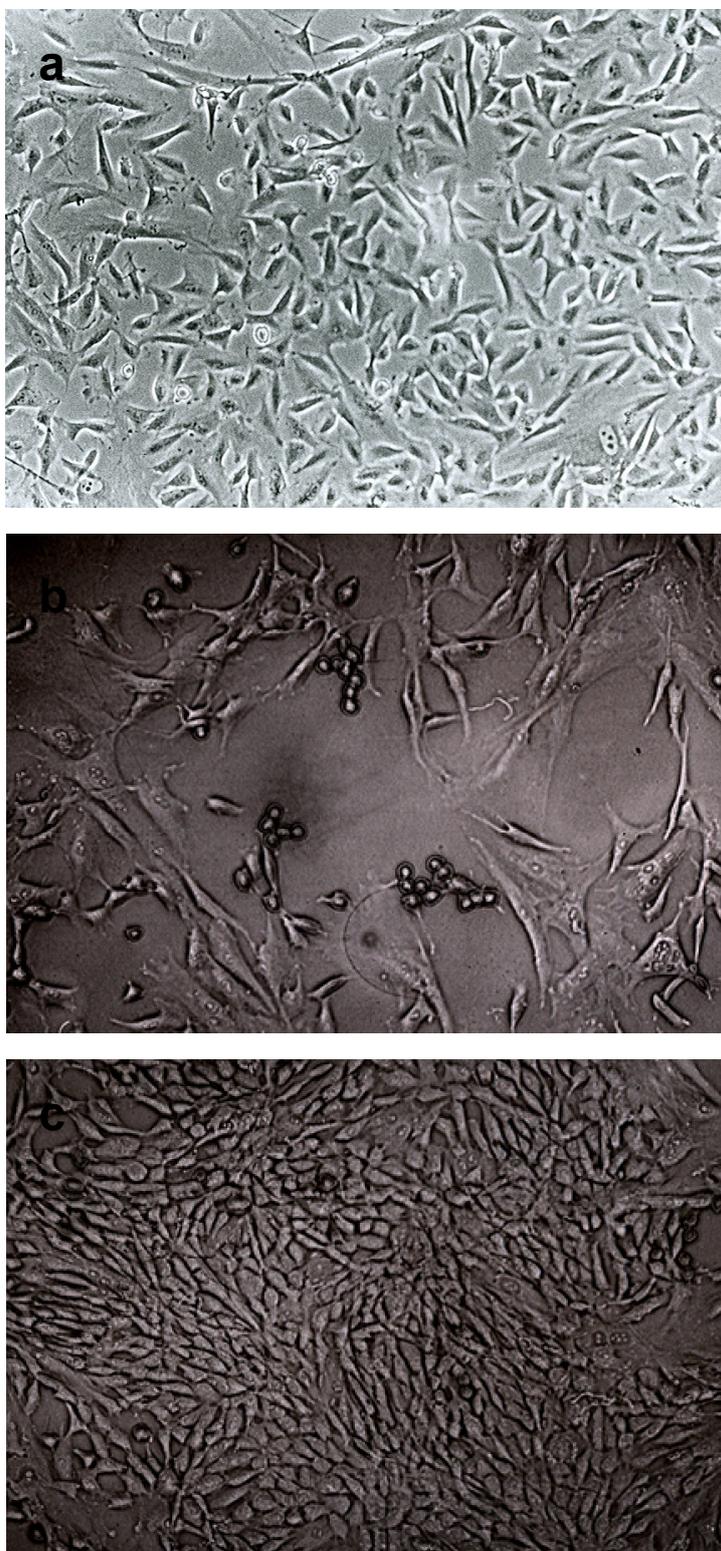


Fig. 10. MDSC pertenecientes a distintos subcultivos (M.O. 100x): a) 13 subcultivo, b) 35 subcultivo y c) 58 subcultivo.

Resultados inmunohistoquímicos

Músculo control antes del aislamiento

Rodeando a la célula muscular esquelética, destacamos la presencia de células que en pequeño número, muestran el inmunofenotipo M-Cadherina (Fig. 11), CD-34, Myf-5 (Fig. 12a), Integrina β -1 (Fig. 12b), α -actina (Fig. 12c) y vimentina. Este perfil, se corresponde con células mesenquimales en el caso de los cuatro primeros marcadores, con células vasculares de pequeños vasos en el caso de la α -actina y con fibroblastos del tejido conjuntivo muscular en el caso de la vimentina. Así también el pequeño número de células positivas para la miosina, mostró en cuanto a su localización con respecto a la célula muscular, características similares a los anteriores marcadores.

Sólo un pequeño número de células situadas en las zonas más periféricas del parénquima, mostraron expresión para la citoqueratina 14 (Fig. 12d) y no existió positividad para el resto de los anticuerpos ensayados.

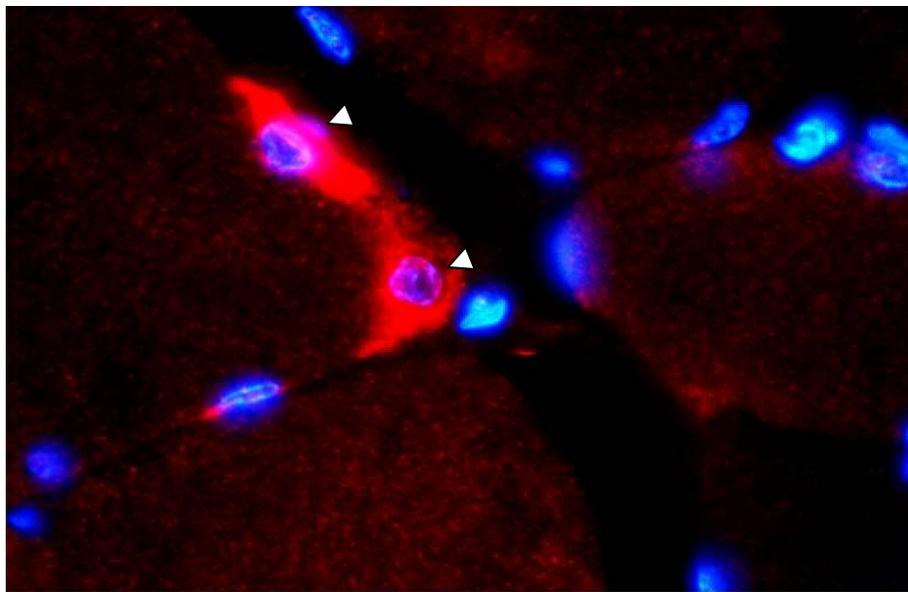


Fig. 11. Expresión del marcador M-Cadherina (Δ) en el músculo dorsal de conejo (M.O. 100x)

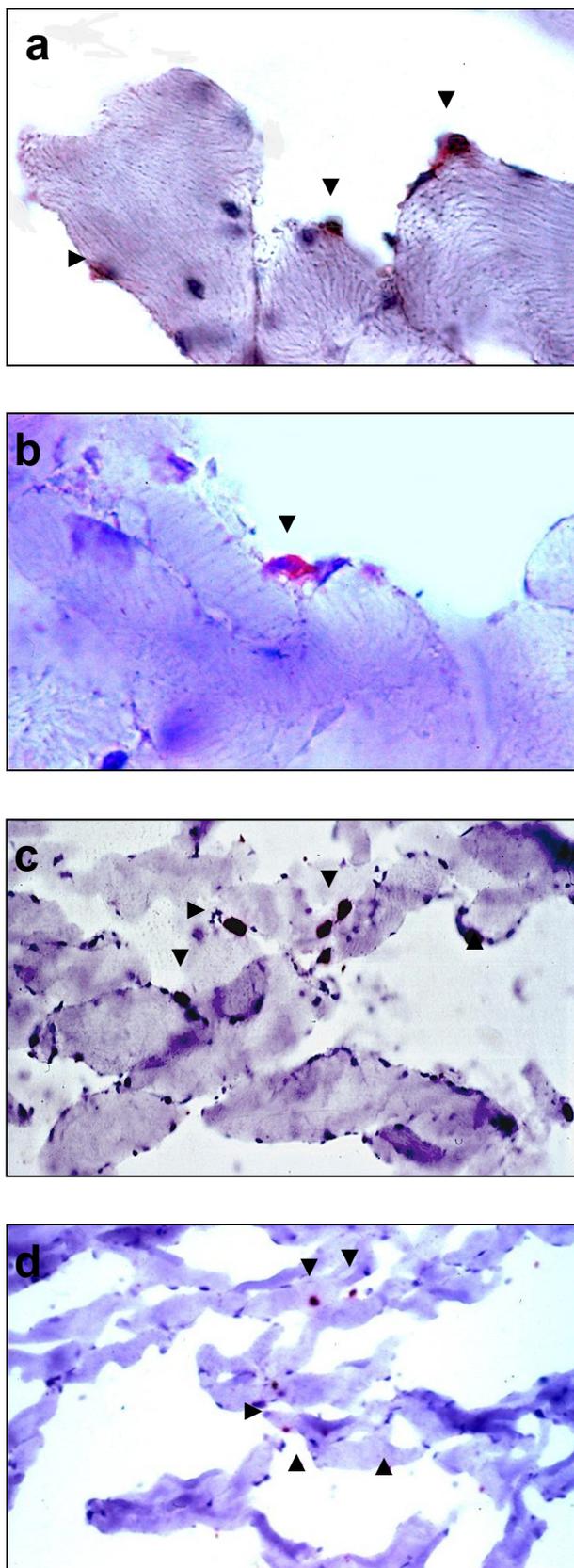


Fig. 12. Músculo dorsal de conejo, células que muestran el inmunofenotipo: a) Myf-5 (▲) (M.O. 630x) y b) Integrina β -1 (▲) (M.O. 630x). c) Pequeños vasos que muestran marcaje con α -actina (▲) (M.O. 200x). d) Población celular marcada con citoqueratina 14 (▲) (M.O. 200x).

Células de 5 días en cultivo

Destacamos la ausencia de expresión de los marcadores ensayados, con excepción de la M-Cadherina, el CD-34 y el Myf-5 en la población adherente (Fig. 13). Si bien, sólo el $10.3\pm 1.8\%$ de la población total, expresaba vimentina (**Tabla VII**).

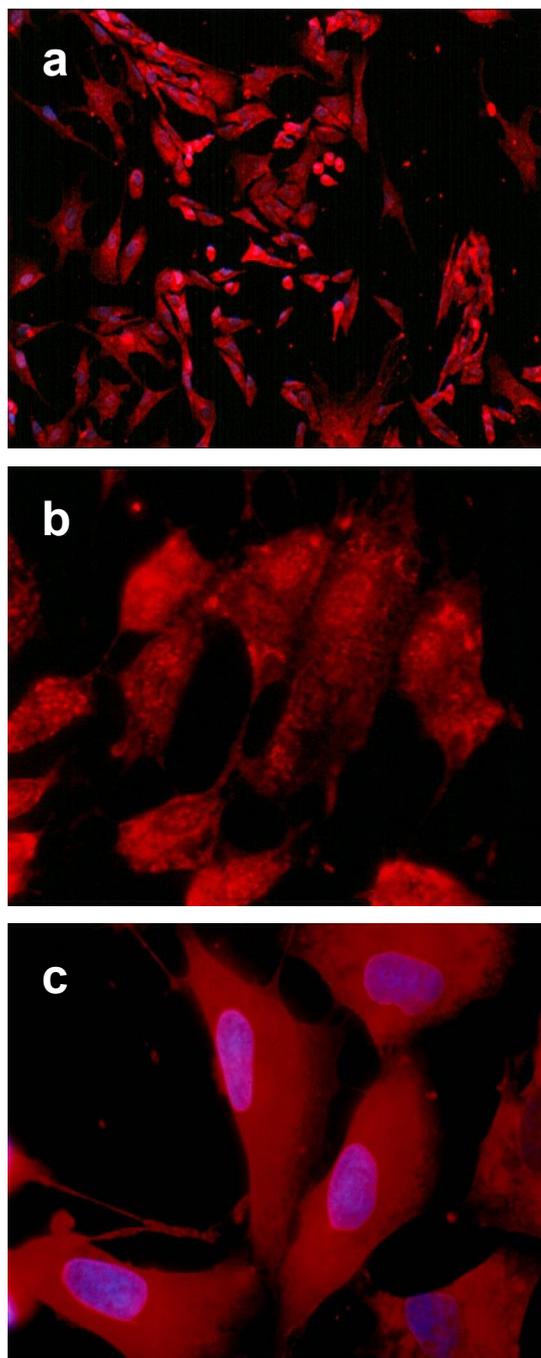


Fig. 13. Expresión de M-Cadherina y CD-34 en las MDSC a los 5 días. a) M-Cadherina (M.O. 200x). b) y c) CD-34 (M.O. 100x y 630x respectivamente).

Células de 14 días en cultivo

Tras dos semanas en cultivo las células continuaban expresando la M-Cadherina (Fig. 14), el CD34 y el Myf-5. Los cambios más destacados, se apreciaron en la expresión fenotípica de los marcadores de diferenciación miogénica (**Tabla VII**), de tal modo que el $94.2 \pm 5.3\%$ de la población expresaba vimentina, el $33.8 \pm 5.1\%$ desmina, un $16.2 \pm 1.6\%$ miosina y únicamente el $8.3 \pm 2.1\%$ α -actina (Fig. 15).

La población no adherente expresó citoqueratina 14 e Integrina β -1 y las células adherentes fueron positivas para syndecan-4. La expresión de fibronectina se localizó en colonias celulares. No observamos marcaje para la citoqueratina 10 (Fig. 16).

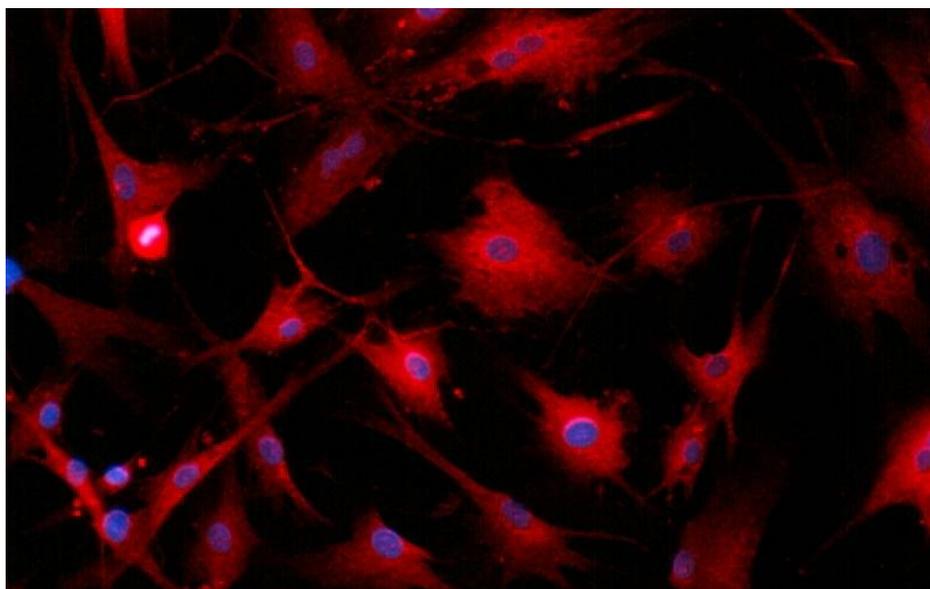


Fig. 14. Expresión de M-Cadherina (M.O. 200x) en las MDSC a los 14 días.

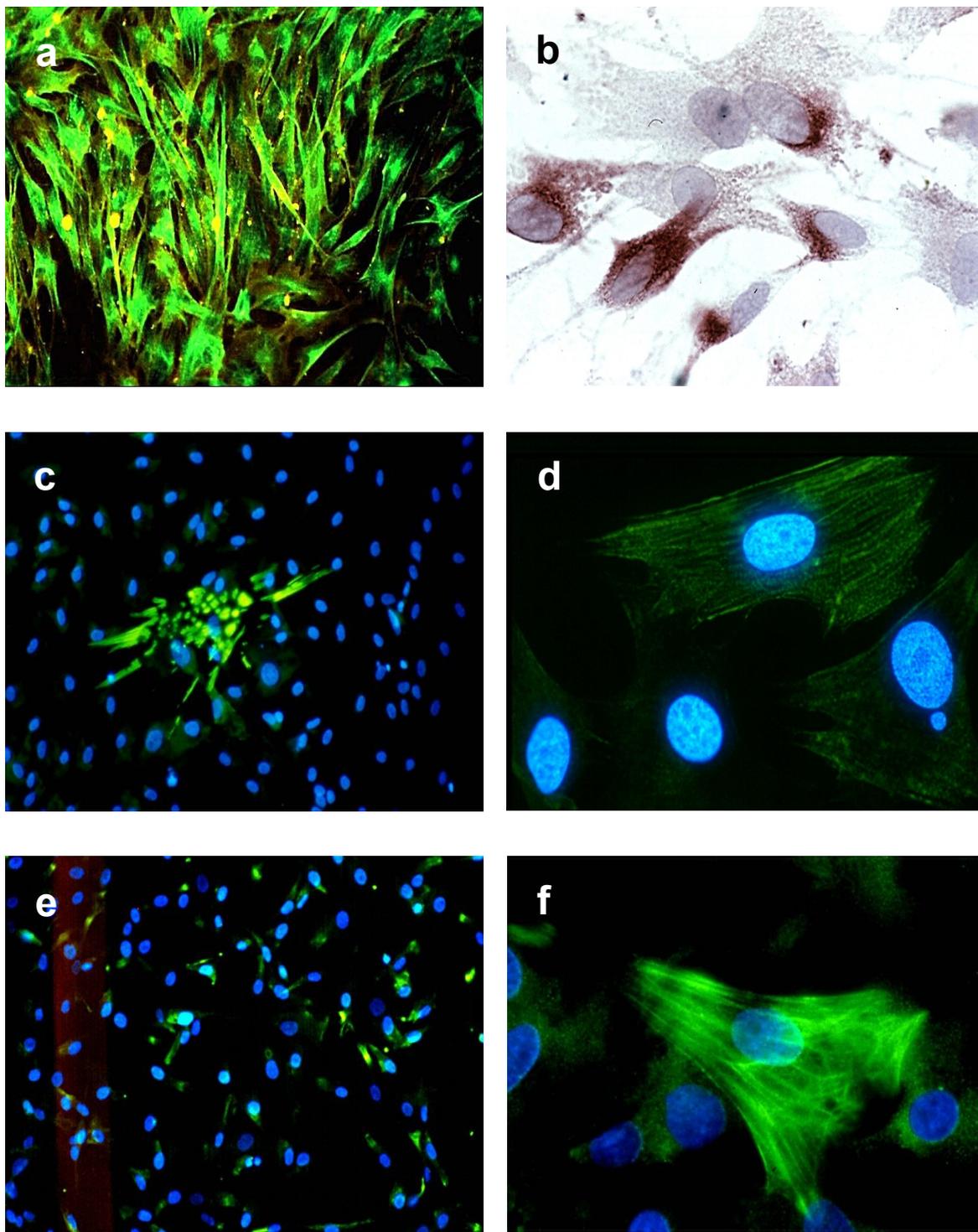


Fig. 15. Expresión de los marcadores de diferenciación muscular en la población adherente tras 14 días de cultivo. a) Vimentina (M.O. 200x). b) Desmina (M.O. 630x). c) El $16.2 \pm 1.6\%$ de la población expresaba miosina (M.O. 100x). d) Miosina (M.O. 1000x). e) El $8.3 \pm 2.1\%$ de la población fue positiva para α -actina (M.O. 100x) y f) α -actina (M.O. 1000x).

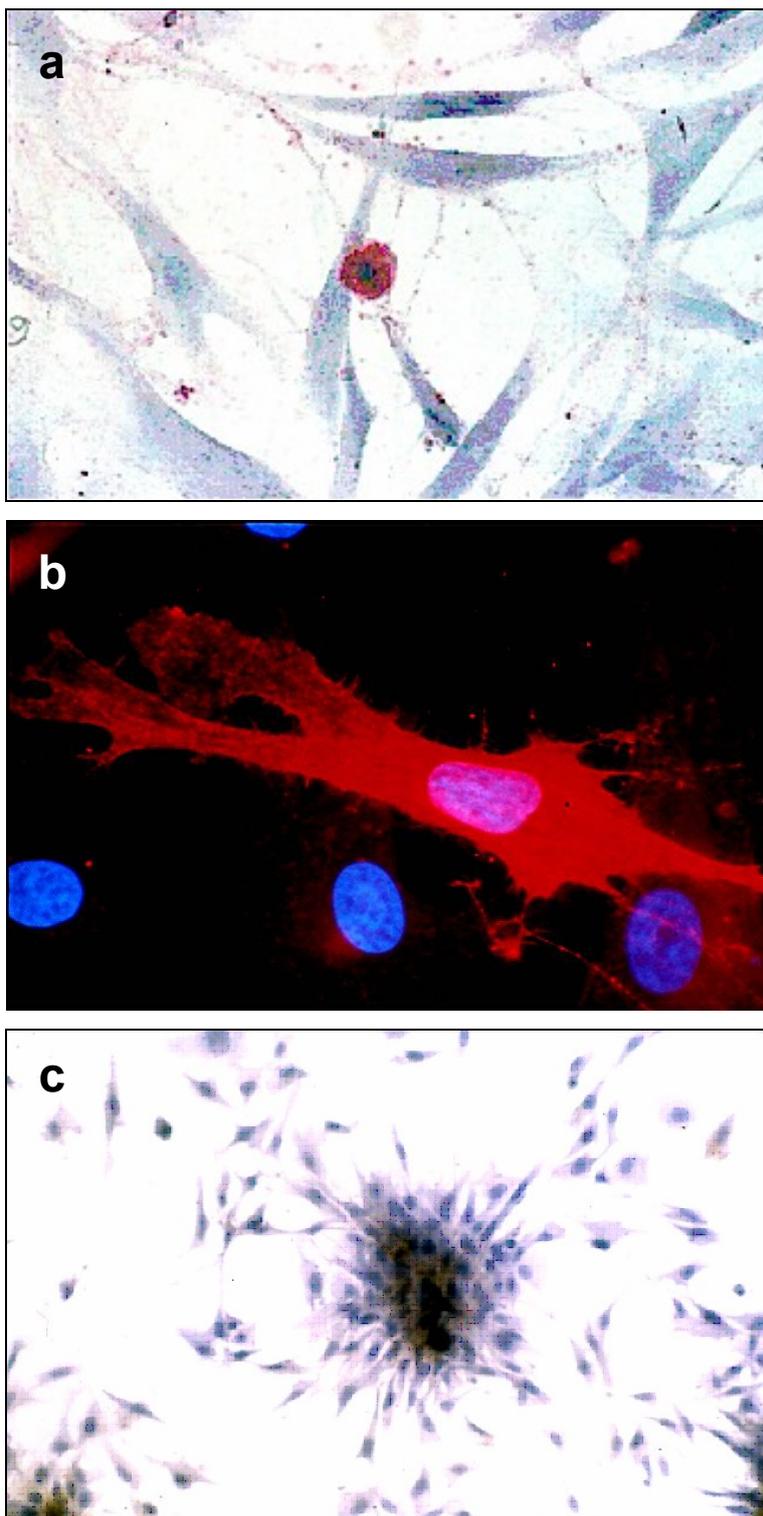


Fig. 16. a) Expresión de Integrina β -1 en la población no adherente (M.O. 400x). b) La población adherente fue positiva para syndecan-4 (M.O. 1000x) y c) Colonia celular marcada para la fibronectina (M.O. 100x).

Fibroblastos

Casi la totalidad de la población expresaba vimentina (99.3 ± 2.1 %). El número de células que expresaban desmina y miosina fue menor que en la población de MDSC, con valores que no excedían del 2 %. En el caso del anticuerpo desmina, la diferencia fue estadísticamente significativa con respecto a la expresión del mismo en la población MDSC ($*p < 0.05$). El marcaje para α -actina tuvo un incremento significativo ($*p < 0.05$) en la población de fibroblastos en comparación con las MDSC, pues alcanzó valores mayores al 60 % (**Tabla VII**). Obsérvese la expresión de los anticuerpos citados en la Fig. 17.

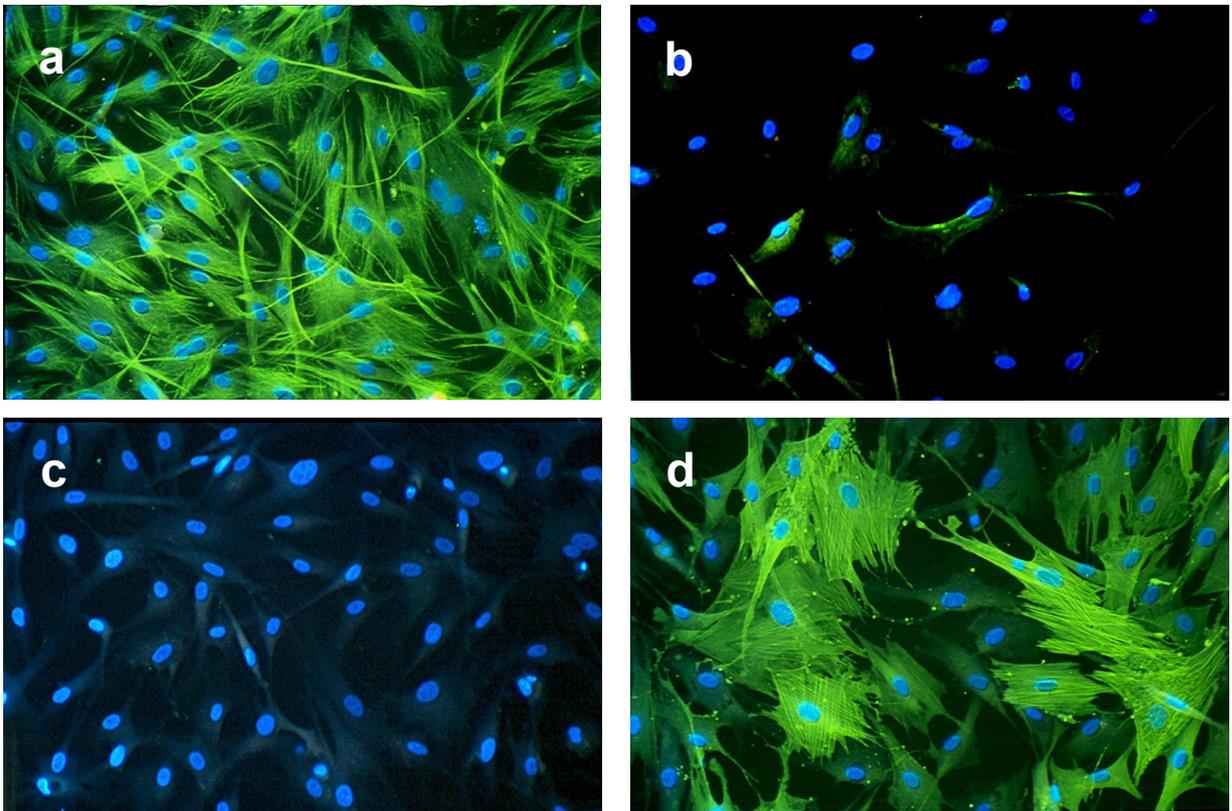


Fig. 17. Expresión de los marcadores de diferenciación muscular en la población de fibroblastos. a) Vimentina (M.O. 200x). b) Desmina (M.O. 200x). c) Miosina (M.O. 200x) y d) α -actina (M.O.200x)

| Anticuerpo | MDSC de 5 Días | MDSC de 14 días | Fibroblastos |
|------------------|----------------|-----------------|--------------|
| Vimentina | 10.3±1.8% | 94.2±5.3% | 99.3±2.1% |
| Desmina | - | 33.8±5.1% | 1.6±0.8%* |
| Miosina | - | 16.2±1.6% | 0.9±0.6% |
| α-actina | - | 8.3±2.1% | 62.2±3.1%* |

Tabla VII. Porcentaje de población celular que mostró expresión para los marcadores de diferenciación muscular (*p <0.05).

Inmunoblotting

Las MDSC y los fibroblastos, mostraron expresión para todos los marcadores analizados (Fig. 18). La banda de la vimentina con un peso molecular de 58 KDa, tenía idénticas características para ambas poblaciones celulares observándose además, otras dos bandas en la parte inferior de esta primera de pesos moleculares ligeramente menores. Por el contrario, las bandas correspondientes a la α-actina, de peso molecular en torno a 42 KDa, revelaron diferencias significativas (*p<0.05) entre las dos poblaciones. La expresión de miosina cuya banda se situó entre 200 y 204 KDa, fue similar en ambos grupos, aunque algo más intensa para la población de MDSC. También existió significación (*p<0.05) en la expresión de la desmina, cuya banda se localizó entre los 50 y 55 KDa. Estos resultados señalan buena correlación con los resultados inmunohistoquímicos.

El TGF β 1, tenía tres bandas claramente observables para las dos poblaciones, una de 20 KDa, y las otras dos que aparecían en forma de dímero y mostraban un peso molecular ligeramente mayor a 79 KDa. En el análisis de las tres bandas, los fibroblastos mostraron una expresión de TGF β 1 significativamente mayor (*p<0.05) que las MDSC (Fig. 19).

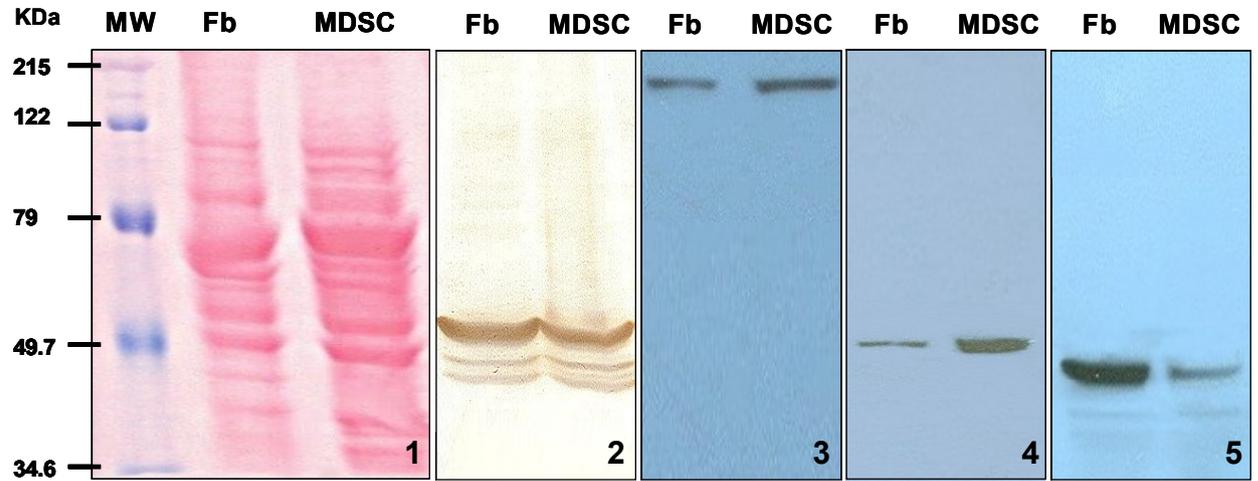


Fig. 18. Inmunoblots de los marcadores de diferenciación muscular examinados en las MDSC y en los fibroblastos. 1) Tinción de las proteínas con Rojo-ponceau, línea izquierda: marcadores de peso molecular (MW), fibroblastos (Fb) y MDSC. Anticuerpos: 2) anti-vimentina, 3) anti-miosina, 4) anti-desmina y 5) anti α -actina.

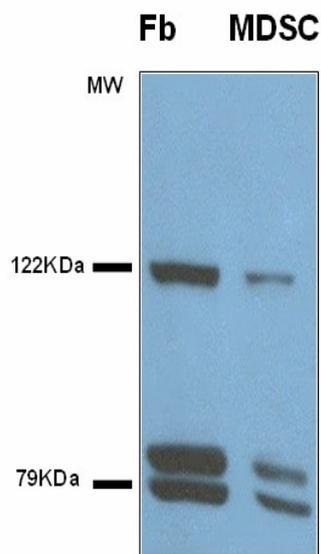


Fig. 19. Western blot para el TGF β 1, línea izquierda: marcador de peso molecular (MW), fibroblastos (Fb) y MDSC.

0.1.3 DISCUSIÓN

Caracterización de las células madre derivadas de músculo.

El tejido músculo-esquelético, como ya señalamos en la introducción, se compone de fascículos formados por miofibrillas especializadas en funciones tisulares específicas. El grado de especialización implica la pérdida de la capacidad de proliferación. Por ello, el crecimiento o el reemplazo de nuevas células en el adulto, depende totalmente de la existencia de una población de células indiferenciadas.

La búsqueda de marcadores específicos para el estudio o la caracterización de estas células indiferenciadas es una tarea difícil, pues hasta la fecha no se ha descrito un protocolo contrastado en cuanto a la utilización de marcadores para su identificación. El método más aceptado hoy en día, se basa en el análisis de su capacidad de replicación “*in vitro*” (Janes y cols., 2002), junto a la expresión de algunos marcadores.

El primer hecho destacable de nuestra población, fue que la tasa de replicación que mostraba, era superior a la de la población de fibroblastos control. Ello avala una de las características que se utilizan para definir a las SC tisulares. El consenso actual, establece que las SC poseen una capacidad de proliferación única que es superior que la que tienen las células aneuploides, pudiendo llegar incluso a ser ilimitada (Rubin, 1997; Potten y Morris, 1988; Reyes y cols., 2001; Rubin, 2002).

En base a estas reflexiones, mantuvimos las MDSC en cultivo a lo largo del tiempo, llegando en la actualidad a alcanzar alrededor de 60 pases. Estos resultados coinciden con los de otros autores que también realizaron cultivos de SC durante periodos de tiempo prolongados, obteniendo diferentes resultados que variaban según la especie, el estadio de desarrollo en el que se encontraba la fuente celular, y según las condiciones de cultivo.

Las células madre embrionarias (ESC), muestran intervalos de expansión que pueden oscilar desde unos 300 pases (Thomson y cols., 1998; Odorico y cols., 2001), 250 pases (Amit y cols., 2000) o 130 pases (Xu y cols., 2001). Con respecto a las células madre adultas (ASC), existen trabajos que documentan que fueron expandidas en cultivo durante 3 meses (Gilmore y cols., 2000) y 6 meses (Piacibello y cols., 1997). De igual manera, se han observado distintos grados de expansión para las SC

procedentes de la médula ósea, que aluden a 30 pases (Colter y cols., 2000), entre 50 y 70 pases (Bianchi y cols., 2003) y 120 pases (Jiang y cols., 2003).

La búsqueda de algunos de los marcadores de MDSC para identificar nuestra población celular, se basó en los factores que regulan la formación de la fibra muscular en el periodo embrionario.

La diferenciación de las MDSC desde sus células precursoras, está mediada entre otras moléculas por los factores de regulación de la miogénesis. Cuatro de ellos aparecen implicados en la diferenciación de esta población en los vertebrados (Weintraub, 1993; Rudnicki y Jaenisch, 1995; Megeney y Rudnicki, 1995; Molkein y Olson, 1996; Ordahl y Williams, 1998; Chargé y Rudnicki, 2004): los genes *Myf-5* y *MyoD* o MRFs primarios, son necesarios para la determinación de mioblastos esqueléticos, mientras que los factores Miogenina y MRF 4, actúan como factores de diferenciación tardíos (Rudnicki y Jaenisch, 1995; Megeney y Rudnicki, 1995; Kablar y Rudnicki, 2000; Tajbakhsh y Buckingham, 2000), interviniendo en la fusión de los precursores miogénicos para llegar a la diferenciación terminal y formar las miofibras multinucleadas.

Puesto que el factor *Myf-5* es expresado en etapas más tempranas del desarrollo que otros MRFs, su expresión representaría un estadio celular indiferenciado en la escala ordenada de estirpes celulares que participarían en la formación del tejido muscular. Además en situaciones de lesión del músculo, la expresión de este factor, promueve la autorrenovación de la población de células satélite, favoreciendo la regeneración muscular; mientras que el *Myo-D*, está implicado en la progresión de la célula satélite hacia la diferenciación terminal (Chargé y Rudnicki, 2004).

Además de la expresión de MRFs para la formación de la miofibra muscular en el periodo embrionario, son necesarios fenómenos de reconocimiento, alineación y fusión de los mioblastos. Estos procesos dependen de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, y están regulados al menos en parte, por variedad de moléculas de adhesión celular (Knudsen, 1990; Dickson y cols., 1990; Rosen y cols., 1992).

Una clase de moléculas posiblemente implicadas en estos procesos de fusión, son las cadherinas, moléculas de adhesión dependientes de calcio intracelular, con una función morforreguladora (Takeichi, 1988; Takeichi, 1991). Las cadherinas, son proteínas transmembrana que establecen uniones intercelulares semiestables mediando la adhesión célula-célula (Chargé y Rudnicki, 2004). En concreto la M-Cadherina, se

postula como una molécula esencial para la fusión de los mioblastos entre sí durante la miogénesis embrionaria y durante procesos de regeneración muscular (Kauffmann y cols., 1999; Moore y Walsh, 1993; Zeschmick y cols., 1995), y de igual manera como sucede con el Myf-5, aparece sobreexpresada en las estructuras miogénicas en estado de regeneración (Moore y Walsh, 1993; Bornemann y Schmalbruch, 1994; Irintchev y cols., 1994).

La expresión de ambos marcadores, podría deberse por tanto a poblaciones celulares que poseen capacidad de autorrenovación. Los resultados inmunohistoquímicos obtenidos, muestran expresión de Myf-5 y de M-Cadherina tanto en los primeros estadios de cultivo como a los 14 días, y esta característica nos mostraría una población celular con poder de autorrenovación. Este potencial proliferativo que sugiere la inmunohistoquímica, y que está también avalado por el estudio de proliferación, coincide con el hecho de poder llevar a cabo un elevado número de subcultivos pudiendo mantener el cultivo durante largos periodos de tiempo, sin observar signos de “desgaste”. La población celular podrá renovarse siempre a expensas de las SC presentes en el cultivo. Estas células madre que identificamos mediante técnicas inmunohistoquímicas tanto en cultivo como en el tejido muscular, muestran en este último una localización que se correspondería a la situación específica de las células satélite identificadas también por otros autores con estos mismos marcadores (Beauchamp y cols., 2000; Morgan y Partridge, 2003). Estas células mononucleares, localizadas en la periferia de las miofibras por encima de la membrana plasmática y por debajo de la lámina basal, permanecen en estado quiescente y sólo son activadas tras una lesión muscular para proliferar y diferenciarse a células musculares, en un proceso que se parece en cierto modo a la miogénesis embrionaria. Otros estudios han comprobado, que la expresión de Myf-5, M-Cadherina o CD-34 está relacionada, pues cuando se expresa uno de los marcadores también lo hacen los otros dos (Zammit y Beauchamp, 2001), hecho que coincide con nuestros resultados.

El CD-34, es una glucoproteína transmembrana que se utiliza para caracterizar otros tipos de SC como progenitores mieloides y células endoteliales (Krause y cols., 1994; Fennie y cols., 1995; Morel y cols., 1996), células perifoliculares de la dermis (Nickoloff, 1990), células ovas y hepatocitos inmaduros (Omori y cols., 1997) entre otros. Sin embargo, cada vez son más los autores que asocian este marcador con células precursoras miogénicas (Gussoni y cols., 1999; Lee y cols., 2000; Torrente y cols., 2001; Qu-Petersen y cols., 2002).

Su expresión en nuestra población tanto en los primeros días como a las dos semanas de cultivo, podría estar relacionada con el hecho demostrado en otros trabajos de que células derivadas de la médula ósea CD 34+, residen en el músculo esquelético (Tamaki, 2002; Majka y cols., 2003). La citada población, podría estar representada por los distintos tipos de SC de músculo asociadas a la vasculatura. La expresión de CD-34 se mantendría tras 14 días, debido al carácter indiferenciado de nuestra población, ya que por analogía con lo que ocurre en el sistema hematopoyético humano, se ha demostrado que la expresión de esta proteína se ve disminuida en células con mayor grado de diferenciación, lo que avalaría el carácter indiferenciado de nuestras células (Andrews y cols., 1989; Krause y cols., 1996).

Un hecho significativo, es que en los primeros estadios del cultivo las MDSC sólo muestran expresión positiva para vimentina, Myf-5, M-Cadherina y CD34, siendo negativas para los demás marcadores utilizados, que nos indicasen indicios de diferenciación única o en diferentes vías.

Tras dos semanas en cultivo, estas células siguen mostrando una intensa expresión para vimentina, propiedad característica de células mesenquimales (García-Miralles y Gosalbez, 2002), aunque este hecho es común en la población de fibroblastos utilizada como control. Sin embargo, no toda la diferenciación es similar en ambas poblaciones aún bajo la influencia del mismo medio de cultivo, y así a este tiempo, las MDSC comienzan a expresar marcadores como la desmina, la miosina, y muy bajos niveles de α -actina reducido a muy pocas colonias aisladas. Para algunos autores el grado de indiferenciación de las MDSC, está relacionado con su capacidad de generar colonias de progenie diferenciada “*in vitro*”. Estos estudios se han llevado a cabo mediante modelos que utilizan, al igual que nosotros, protocolos de disgregación enzimática del tejido muscular (Bischoff, 1974; Blau y Webster, 1981; Yablonka-Reuveni y cols., 1987). En estos casos, las células obtenidas, proliferan formando colonias, y algunas de estas colonias mantienen capacidad de diferenciarse hacia células de la línea miogénica. Se piensa que las células con características miogénicas, podrían derivar de las células satélite (Zammit y Beauchamp, 2001). Esta capacidad de generar células con características músculo-esqueléticas, atribuida a las células satélite, ha sido observada tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” (Moss y Leblond, 1971; Rosenblatt y cols., 1995).

Este hecho podría explicar que tras 14 días en cultivo, un cierto porcentaje de células expresara marcadores de diferenciación muscular, y en consonancia con los

hechos anteriores, se podría indicar que estas células derivarían de células satélite presentes en el cultivo, que se aislaron de la fibra muscular tras el proceso de extracción.

La expresión de estos marcadores, muestra diferente patrón en los fibroblastos en el momento de estudio en el que se encuentran las dos poblaciones. Los fibroblastos dérmicos, adquirirían características de miofibroblastos como muestra la expresión inmunohistoquímica de α -actina en más de la mitad de la población estudiada. Esta transformación, podría deberse en momentos iniciales a la presencia de TGF- β en el medio de cultivo, y en momentos posteriores a un mecanismo autocrino dada la importante síntesis del mismo por parte de las células fibroblásticas que pudimos apreciar mediante la técnica de Western blot. El TGF- β , estimularía el desarrollo de fibras intracelulares de estrés, que contendrían isoformas citoplasmáticas de actina que induciría la transformación de fibroblastos en miofibroblastos (Hinz y Gabiani, 2003).

Además de las moléculas previamente descritas, en la etapa embrionaria, existen otras también implicadas en la diferenciación de las células musculares desde sus células precursoras. Ciertos factores de crecimiento (FC), como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), son de relevante importancia, pues participan en la activación, migración y regulación de la diferenciación de la célula muscular en el futuro organismo (Hawke y Garry, 2001).

La señalización que aporta el HGF, promueve la migración de los mioblastos desde los somitas hacia las áreas donde se encontrarán los músculos que van a formarse (Bladt y cols., 1995), siendo también necesario para la miogénesis secundaria (Maina y cols., 1996). Por su parte el FGF, regula el crecimiento y diferenciación de los mioblastos primarios en etapas tempranas, así como de los mioblastos secundarios y adultos (Flanagan-Steet y cols., 2000).

Las señales de estos FC son transducidas entre otros, por receptores de heparán sulfato presentes en casi todas las matrices extracelulares y células eucariotas, existiendo hallazgos que sugieren un papel esencial de los mismos en la consecución de la miogénesis. Varios estudios con una línea de células satélite de reconocida capacidad para originar diferenciación miogénica “*in vitro*” tras la retirada del suero del medio de cultivo (Blau y cols., 1985), designada como C2C12 y aislada de músculo esquelético de ratón adulto en estado de regeneración, han demostrado que la inhibición con

cloratos de los receptores de heparán sulfato en estos cultivos celulares (Melo y cols., 1996; Osses y Brandan, 2001) o en miofibras intactas (Cornelison y cols., 2001), afecta a la progresión del programa miogénico “*in vitro*”. Otros estudios basados en la administración de polímeros sintéticos que mimetizaban a los receptores de heparán sulfato, mostraron la aceleración de la reinervación y regeneración del músculo esquelético (Desgranges y cols., 1999).

Los receptores de heparán sulfato, engloban una familia de receptores transmembrana denominados syndecanes, que modulan las señales de los FC e influyen en el crecimiento y la diferenciación celular, además de participar en procesos de migración celular (Liebersbach y Sanderson, 1994).

Para algunos autores el syndecan-3 y el syndecan-4, son expresados por los miocitos en desarrollo durante la formación de los músculos esqueléticos en el periodo embrionario (Cornelison y cols., 2001; Olguin y Brandan, 2001).

El syndecan-4, se localiza en áreas de adhesiones focales en tipos celulares adherentes incluyendo fibroblastos, células musculares lisas y células endoteliales (Woods y Couchman, 1994). Las adhesiones focales son regiones especializadas de la membrana plasmática que median adhesiones fuertes entre la célula y la matriz extracelular. Poseen proteínas especializadas y proteínas del citoesqueleto, y son lugar de unión de los filamentos de actina a la membrana (Burrige y cols., 1988). La asociación de syndecanes con el citoesqueleto, también ayuda a estabilizar la adhesión celular. Podría establecerse una similitud, entre los cambios que según ciertos autores ocurren en la expresión de estos receptores con la diferenciación celular, y que están fundamentalmente asociados a cambios en la morfología celular (Carey, 1997) y el cambio que experimentan nuestros cultivos en cuanto a la expresión de los mismos en ambos tiempos de estudio (5 y 14 días). Este hecho podría relacionarse con la transformación morfológica que acontece desde los primeros días del cultivo hasta las dos semanas, y con la aparición a este tiempo, de discretos signos de diferenciación celular por parte de algunas células que mostraban marcadores de diferenciación miogénicos.

Las mejores evidencias de un papel específico de los syndecanes en la adhesión celular, se basan en estudios de formación de adhesiones focales en respuesta a la unión a fibronectina (Carey, 1997). La fibronectina, es una proteína de adhesión dotada de numerosas funciones, entre las que destaca la de fijar las células a una serie de matrices. Es una gran glucoproteína (de 450 KD aproximadamente), formada por dos cadenas que

se mantienen unidas por puentes disulfuro. Se encuentra en la superficie de las células, las membranas basales, y las matrices pericelulares; es elaborada por los fibroblastos, monocitos y células endoteliales entre otras. La fibronectina se une a varios componentes de la matriz extracelular (como el colágeno, fibrina y proteoglicanos) por varias regiones específicas, y a las células por sus receptores, los cuales reconocen la secuencia específica de aminoácidos que tiene el tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). El elemento que reconoce al RGD desempeña un papel clave en la adhesión entre la célula y la matriz. Se cree que la fibronectina participa directamente en esa unión, donde sirve para potenciar la sensibilidad de ciertas células, a los efectos proliferativos de los FC (Cotran y cols., 2000).

La secreción de fibronectina por parte de las MDSC a los 14 días, estaría relacionada con la presencia de syndecan-4 en las mismas y con la expresión de TGF- β observada en el Western blot. El papel de los FC en la regulación de la proliferación y de la diferenciación de las células precursoras musculares “*in vitro*” está bien establecido. La capacidad de las células precursoras de músculo para diferenciarse, está inhibida por la concentración extracelular de diferentes mitógenos, como TGF - β (Florini y cols., 1986; Ewton y cols., 1988). En su presencia las células precursoras continúan proliferando y no se fusionan o expresan genes específicos de músculo, dato de gran utilidad para el cultivo y la expansión de nuestras células, que podrán mantener así un inmunofenotipo estable, adecuado para ser aplicado posteriormente como terapia celular, en las heridas creadas. Este hecho, se corroboró más tarde con la expresión positiva del marcador M-Cadherina en las heridas tratadas.

Por ello podemos afirmar que tras 14 días en cultivo, contamos con una población celular que principalmente se compone de células precursoras, con capacidad de proliferación, adhesión y migración y con el potencial suficiente para diferenciarse según los estímulos del medio ambiente, lo cual recapitula propiedades biológicas muy atractivas, para la aplicación de estas células en el diseño de un modelo experimental de cicatrización de heridas.

O.2 SEGUNDO OBJETIVO

Aplicación de las MDSC como terapia celular sobre un modelo experimental de defecto excisional cutáneo

Tras el aislamiento y caracterización de las MDSC, nos propusimos evaluar su utilidad en la cicatrización de las heridas, aplicadas como terapia celular en un defecto excisional cutáneo realizado en la oreja del animal de experimentación.

O.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron los mismos animales de experimentación de los que se tomó la biopsia muscular para la extracción de las células. Éstos fueron estabulados en condiciones de luz y temperatura constantes durante todo el tiempo de estudio (Normativa de la CEE 2871-229).

Marcaje fluorescente de las células

Una vez obtenidas las células según el protocolo descrito en el primer objetivo, se procedió a su marcaje “*in vitro*” para su seguimiento dentro de la herida. Se utilizó PKH-26 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A), marcador fluorescente que tiene la propiedad de intercalarse en la membrana celular.

Se tomaron células en primer subcultivo, que fueron levantadas con tripsina/EDTA 1X (según el método desarrollado en el primer objetivo para la realización de los subcultivos). Tras la neutralización de la tripsina, se centrifugaron a 1050 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 1 ml de Amniomax (Gibco), determinando a continuación la viabilidad celular con Azul Tripán sobre una cámara de NEUBAUER (Marienfeld, Alemania).

Las células fueron diluidas en el colorante a razón de (1:9), y el recuento se realizó en un microscopio óptico OLYMPUS BH. El número de células por mililitro se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células viables} \times 10^5}{\text{Factor de dilución}}$$

Se tomaron $4 \cdot 10^6$ de células para el marcaje con PKH-26 y su posterior siembra en cada defecto. El marcaje fluorescente se llevó a cabo según la metodología descrita por Fox y cols., en 1999. Las células fueron incubadas en tampón de unión $10 \mu\text{M}$ durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación para asegurar un marcaje homogéneo. La reacción finaliza tras la adición de FCS. La suspensión celular marcada, fue diluida con M.E.M y posteriormente lavada y centrifugada varias veces para eliminar posibles restos del marcador.

De nuevo, se determinó la viabilidad celular mediante el método del Azul Tripán. A continuación, se centrifugó a 1050 rpm durante 5 minutos, y el precipitado obtenido se resuspendió en 0.5 ml de Amniomax (Gibco).

Transplante celular en los defectos

Tras la anestesia del animal de experimentación, se realizó un defecto de 2 cm de diámetro en el dorso de cada una de las orejas mediante un dispositivo rígido, cilíndrico y cortante diseñado al efecto para asegurar un defecto siempre idéntico. Se respetó el tejido correspondiente al pericondrio del cartílago de la oreja (modelo modificado de Ahn y Mustoe, 1990).

El defecto realizado en la oreja derecha, se recubrió con un lecho de fibrina procedente de la sangre del propio animal, y se sembró con las células autólogas marcadas. La oreja se mantuvo en posición horizontal el tiempo necesario para permitir la adhesión de las células sobre la superficie de la herida (25-35 minutos), y se protegió con una cubierta de polietileno de diseño propio, con el fin de facilitar la comunicación con el exterior a través de una abertura situada en cada uno de sus dos extremos. La cubierta se colocó siguiendo el eje longitudinal de la oreja y se ancló mediante puntos de sutura.

El defecto realizado en la oreja izquierda se dejó como control sin tratamiento y se protegió de igual manera que la oreja tratada. A continuación, se colocó un collarín alrededor del cuello del animal para evitar que éste manipulara las heridas con sus extremidades. El esquema del proceso global y las imágenes se muestran en la Fig.20.

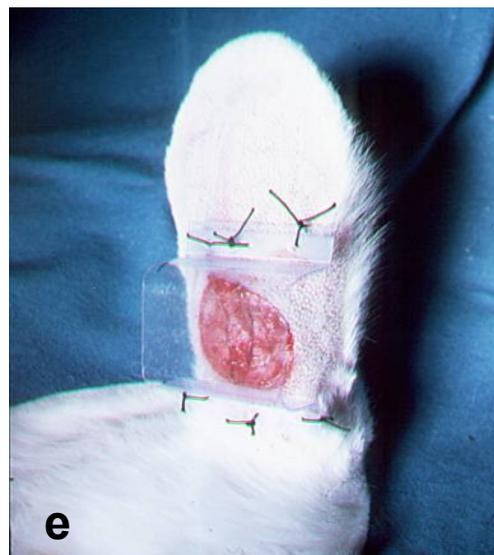
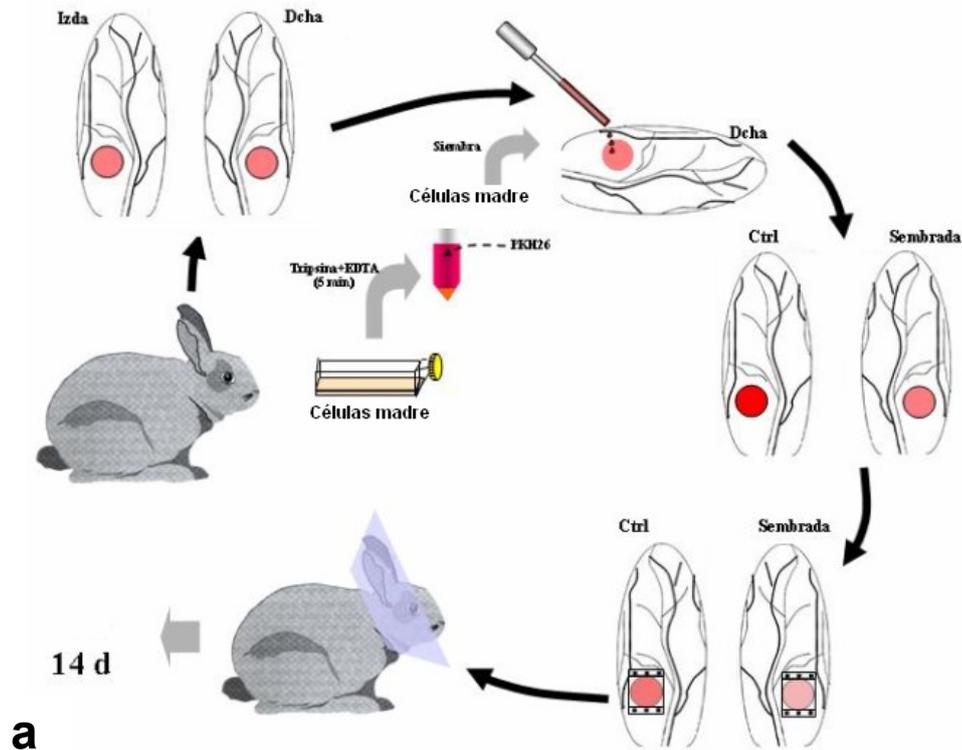


Fig. 20. Diagrama (a) e imágenes (b-e) ilustrando el proceso de siembra de células madre en los defectos cutáneos. b) Defecto de 2 cm. de diámetro. c) Lecho de fibrina, como sustrato de las células. d) Siembra de las células. e) Herida protegida con una cubierta de polietileno.

Diseño experimental

Fueron empleados un total de 10 animales a los que se les practicó un defecto en cada una de las orejas (n=20 defectos). El tiempo de estudio fue de 14 días, estableciéndose los siguientes grupos de estudio:

-*Grupo I – control (n=10)*: defectos sin tratamiento.

-*Grupo II (n=10)*: defectos que fueron tratados con transplante de células madre.

Estudios macroscópicos

A nivel macroscópico, los defectos creados fueron evaluados en cuanto a los fenómenos de contracción y recubrimiento. Las áreas de contracción y reepitelización se estudiaron por histomorfometría.

Los estudios morfométricos se realizaron mediante técnicas de análisis de imagen, determinando los porcentajes de contracción y de reepitelización de los defectos en los dos grupos de estudio. Los análisis se realizaron con un programa informático de diseño gráfico (Photoshop 5.0), sobre imágenes macroscópicas de los defectos tomadas antes y después de los trasplantes celulares.

Una vez obtenidas las imágenes esquemáticas, éstas fueron analizadas mediante técnicas computarizadas de análisis de imagen, mediante un programa informático de medición morfométrica (MIP-4; MICROM, Barcelona). Se analizó, tanto la superficie total de los defectos como la superficie no epitelizada en los distintos grupos. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando la U de Mann Whitney y ANOVA.

Estudios histológicos

a) Técnicas de microscopia óptica

Se tomaron secciones de la parte central de las heridas de extremo a extremo de las mismas y se fijaron en una solución de formaldehído al 10% en agua destilada. Posteriormente, se procedió a su deshidratación e inclusión en parafina y al

procesamiento de los bloques según se describió con detalle en las técnicas de microscopía óptica del primer objetivo.

- **Técnicas de tinción**

Se emplearon tres técnicas de tinción: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson (variante de Goldner-Gabe) y rojo sirio.

-Hematoxilina-eosina:

Previamente a la tinción se procedió al desparafinado y a la rehidratación de las muestras.

* Desparafinado de la muestra:

Xilol 20-60 minutos.

(2 pases, el último con Xilol completamente limpio)

* Rehidratación:

Alcohol 100° 5 minutos.

Alcohol 96° 5 minutos.

Alcohol 70° 5 minutos.

Lavado de las muestras con agua 15 minutos.

* Tinción:

Hematoxilina de Carazzi 20 minutos.

Lavado en agua corriente 5 minutos.

Eosina 2-3 minutos.

Lavado en agua 5 minutos.

* Deshidratación:

| | |
|--------------|------------|
| Alcohol 70° | 5 minutos. |
| Alcohol 96° | 5 minutos. |
| Alcohol 100° | 5 minutos. |

* Montaje de las preparaciones:

Para el montaje de las muestras se utilizó bálsamo del Canadá diluido en xilol y fueron cubiertas con portaobjetos de 24 x 50 mm.

-Tricrómico de Masson:

Para el tricrómico de Masson (variante de Goldner-Gabe) se procedió al desparafinado y rehidratación de las piezas de la misma forma que para la técnica de hematoxilina-eosina. La tinción se realizó de la siguiente forma:

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| Hematoxilina de Carazzi | 20 minutos. |
| Virado en agua corriente | 5 minutos. |
| Fuchina ácida – PONCEAU | 5 minutos. |
| Lavado rápido con agua acética al 1% | |
| Orange G - Ácido fosfomolibdico | 5 minutos. |
| Lavado rápido con agua acética al 1% | |
| Verde luz | 10 minutos. |
| Agua | 5 minutos. |
| Alcohol 96° | 1-2 minutos. |
| Alcohol de 100° | 5 minutos. |

Xilol

Los cortes se montaron de la misma manera que en la técnica anterior.

-Rojo Sirio

Se empleó una solución de rojo sirio (Direct red 80, Sigma, WI, USA) al 1% en ácido pícrico. Las muestras se desparafinaron e hidrataron y se procedió a la tinción de la siguiente manera:

| | |
|-------------------------|------------|
| Rojo Sirio | 30 minutos |
| Lavado en agua | |
| Hematoxilina de Weigert | 10 minutos |
| Lavado en agua | |
| Alcohol 100° | |
| Xilol | |

Las preparaciones se montaron igual que en los casos anteriores.

b) Técnicas de microscopía electrónica

Para el estudio de microscopía electrónica de barrido se tomaron heridas enteras y para microscopía electrónica de transmisión, pequeños fragmentos de la zona central de las mismas.

Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% a 4°C. Transcurrida 1 hora en las piezas destinadas a microscopía electrónica de barrido y 2 horas en las de microscopía electrónica de transmisión, se sustituyó el fijador por tampón Millonig. Seguidamente, se procedió como se desarrolló en el primer objetivo.

Estudios inmunohistoquímicos

Se tomaron secciones de la parte central de la heridas de extremo a extremo de las mismas y se fijaron, según el anticuerpo utilizado, en líquido de Bouin (Panreac, Barcelona) durante 1 h o en congelación a -80°C .

El procesamiento de las muestras, se llevó a cabo mediante técnicas de microscopía óptica. Se realizó inmunohistoquímica convencional en todos los casos y se emplearon los anticuerpos señalados en la **tabla VIII**.

Tabla VIII. Anticuerpos y fijador utilizados en inmunohistoquímica.

| Anticuerpo (dilución empleada) | Especificidad | Subclase de Ig G | Proveedor | Fijador |
|---|---|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Vimentina (1:40) | Mouse Monoclonal anti- Vimentin | Mouse Ig G 1 | Sigma, St. Louis, U.S.A | Bouin 1 h |
| α -actina (1:400) | Mouse Monoclonal anti- α Smooth Muscle Actin | Mouse Ig G 2a | Sigma, St. Louis, U.S.A | Bouin 1 h |
| Desmina (1:20) | Mouse Monoclonal anti- Desmin | Mouse Ig G 1 | Sigma, St. Louis, U.S.A | Bouin 1 h |
| Miosina (1:200) | Mouse Monoclonal anti- Myosin (smooth) | Mouse Ig G 1 | Sigma, St. Louis, U.S.A | Congelación -80°C |
| Fibronectina (1:200) | Mouse Monoclonal to cellular Fibronectin | Mouse Ig G 1 | Abcam, CB, UK | Congelación -80°C |
| Citoqueratina 14 (lista para usar) | Mouse Monoclonal anti-human Cytoqueratin 14 | Mouse Ig G 3 | Novo Castra, NE, UK | Congelación -80°C |
| M-cadherina (1:75) | Goat polyclonal anti- M-Cadherin (N-19) | Goat Ig G | Santa Cruz Biotechnol. USA | Congelación -80°C |

Análisis estadístico

Los datos de los experimentos de reepitelización y contracción se expresaron como la media \pm desviación estándar. El test de la U de Mann-Whitney fue utilizado para comparar las medias. La significación estadística se estableció en * $p < 0.05$.

0.2.2. RESULTADOS

Estudios macroscópicos

a) Contracción de la herida

Desde el punto de vista macroscópico, el fenómeno de contracción fue significativamente superior en el grupo control que en el tratado, el hecho de que la herida se contraiga, implica menor área del defecto (1.83 cm^2 vs 2.72 cm^2 ; $*p<0.05$). Expresándolo en porcentaje de contracción pudimos observar un $50.83 \pm 12.84 \%$ en el grupo control frente a un $22.25 \pm 9.56 \%$ en el grupo sometido a terapia celular (Fig.21).

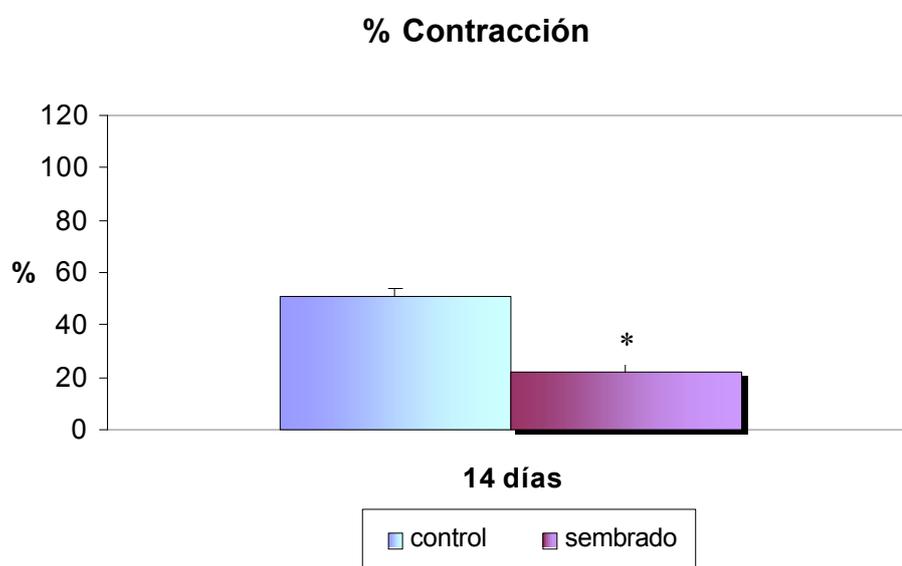


Fig. 21. Porcentajes de contracción para los 2 grupos de estudio, ($*p<0.05$).

b) Reepitelización

El área de reepitelización fue significativamente mayor en el grupo tratado que en el grupo control (2.50 cm^2 vs 1.29 cm^2 ; $*p<0.05$). Los respectivos porcentajes de las áreas reepitelizadas fueron de $96.33 \pm 3.09 \%$ vs $70.91 \pm 6.94 \%$ (Fig. 22).

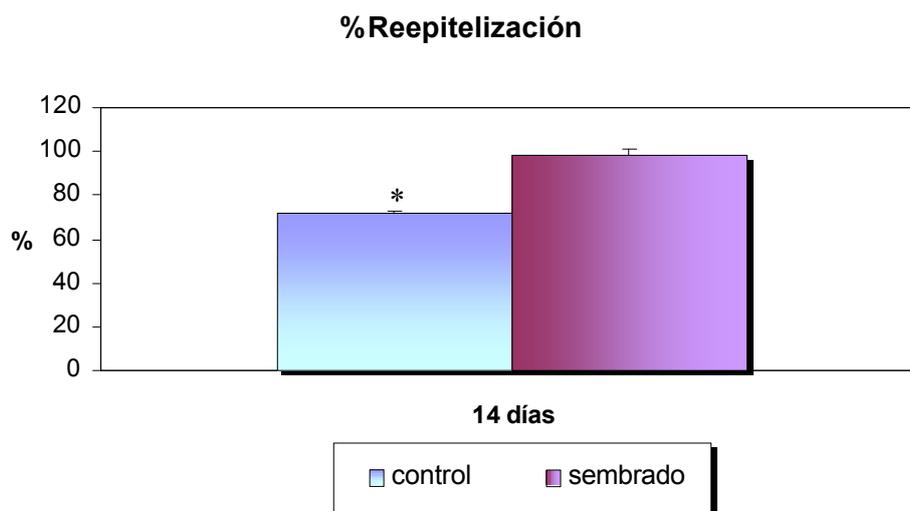


Fig. 22. Porcentajes de reepitelización para los dos grupos de estudio, (* $p < 0.05$)

La observación de “visu” de ambos defectos, mostraba, sobre las orejas control la existencia de áreas con exposición de tejido subcutáneo, mientras que en el grupo que había recibido terapia celular la solución de continuidad sobre el defecto era prácticamente completa (Fig. 23 y 24).

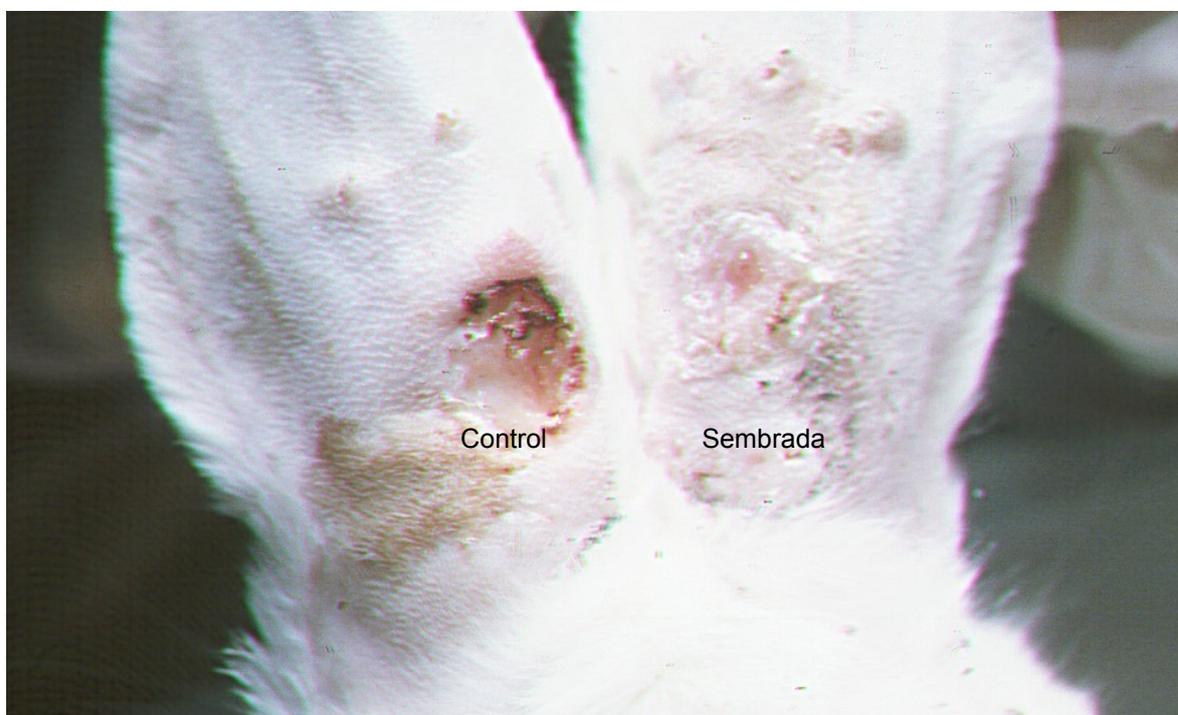


Fig. 23. Aspecto de las heridas control y sembrada a los 14 días tras la terapia celular.

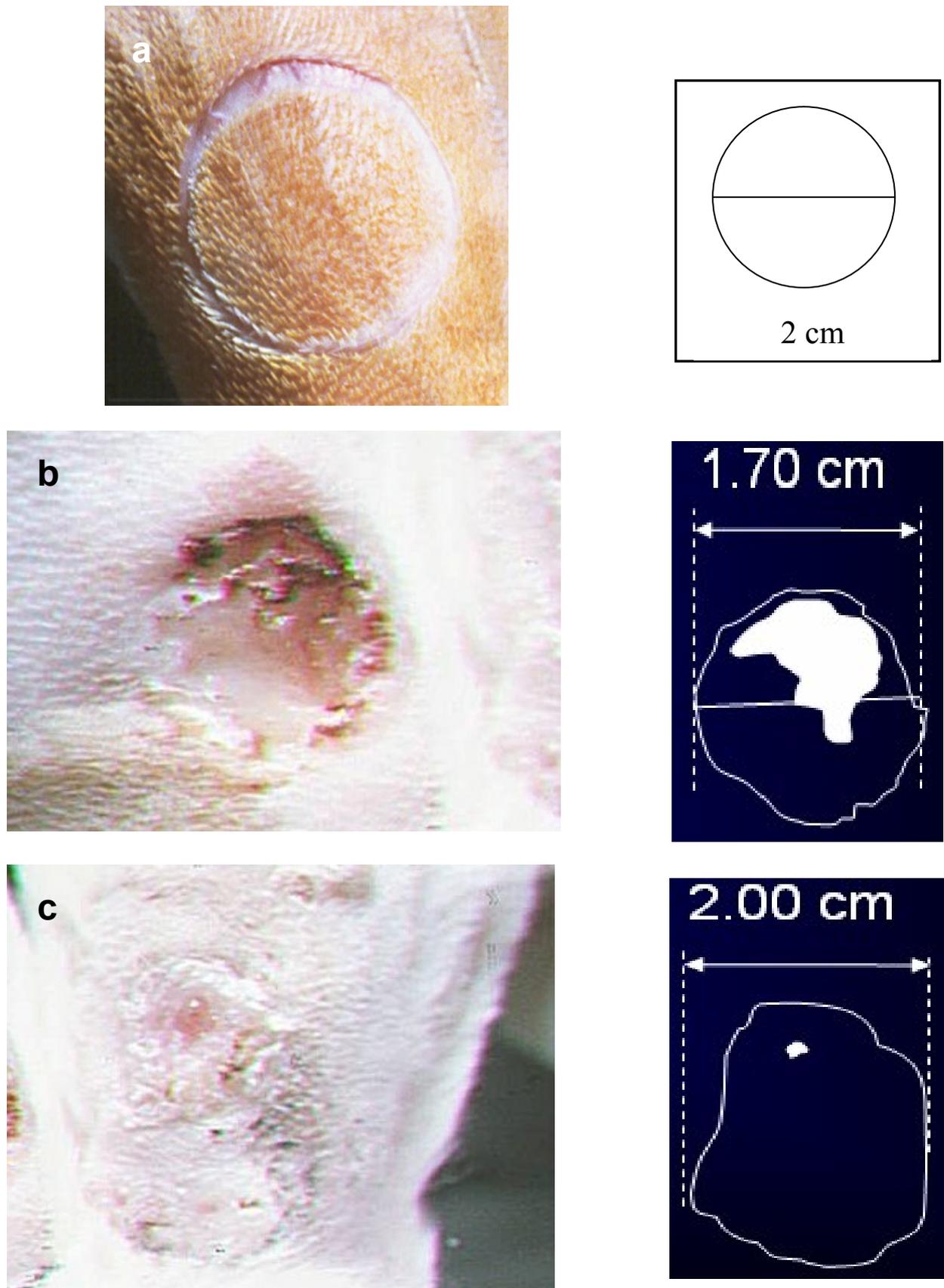


Fig. 24. Imágenes macroscópicas de los defectos: a) Realización del defecto de 2 cm. b) Detalle del defecto control a los 14 días. c) Detalle del defecto sometido a terapia celular a los 14 días. Obsérvese una mayor contracción en el defecto control con respecto al defecto sembrado con células madre, y la mayor reepitelización en este último grupo.

Estudios histológicos

Mediante la microscopía óptica, pudimos observar como el proceso cicatricial en las heridas control, avanza a partir de los bordes sanos del defecto (Fig. 25). En este proceso encontramos con frecuencia en las áreas más superficiales, células blancas, células de características epiteliales y yemas vasculares (Fig 26).

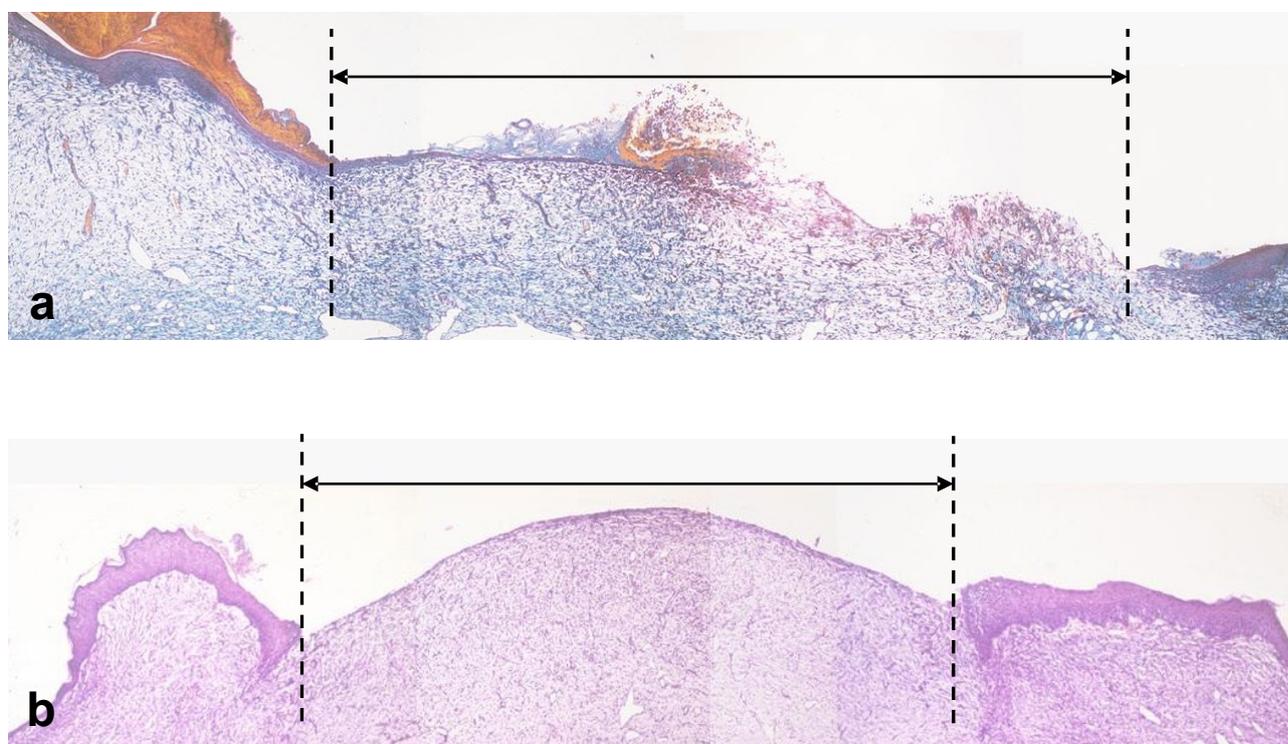


Fig. 25. Áreas no epitelizadas a los 14 días (↔): a) En las heridas control, Tricrómicro de Masson (M.O 100x) y b) En las heridas sembradas, Hematoxilina-eosina (M.O 100x).

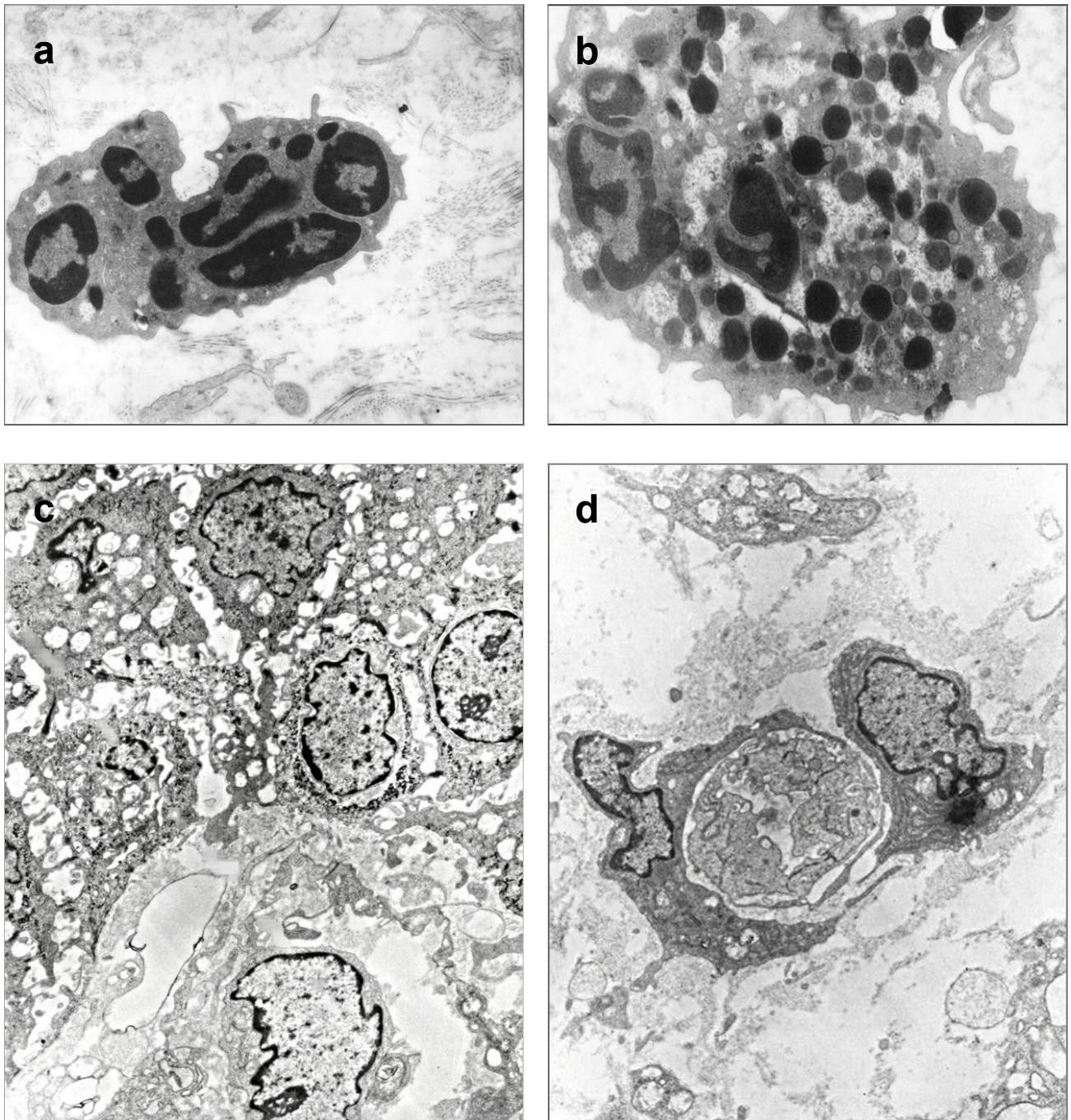


Fig. 26. Ultraestructura de la superficie de las heridas control: a) y b) Células blancas (MET, 7000 x), c) Células de características epiteliales (MET 3000 x) y d) Yema vascular (MET 4000 x).

La tinción rojo sirio, se ha utilizado como marcador específico para la detección del colágeno en secciones titulares (Junqueira y cols., 1979). Con ella pretendemos valorar la madurez del componente colágeno por interacción y orientación entre los grupos sulfónicos del colorante rojo sirio con los grupos amino de la lisina e hidroxilisina y los grupos guanidina de la arginina correspondiendo la intensidad del color, con la madurez del colágeno. Apareciendo en intensidad roja el colágeno compacto y maduro correspondiente al colágeno I, e identificando aquel más inmaduro por la tonalidad amarillo verdosa que alcanza. Se pudo observar la presencia de colágeno tipo III en color amarillo en los defectos control (Fig. 27) y de colágeno tipo I o maduro (rojo) en las orejas sembradas (Fig 28).

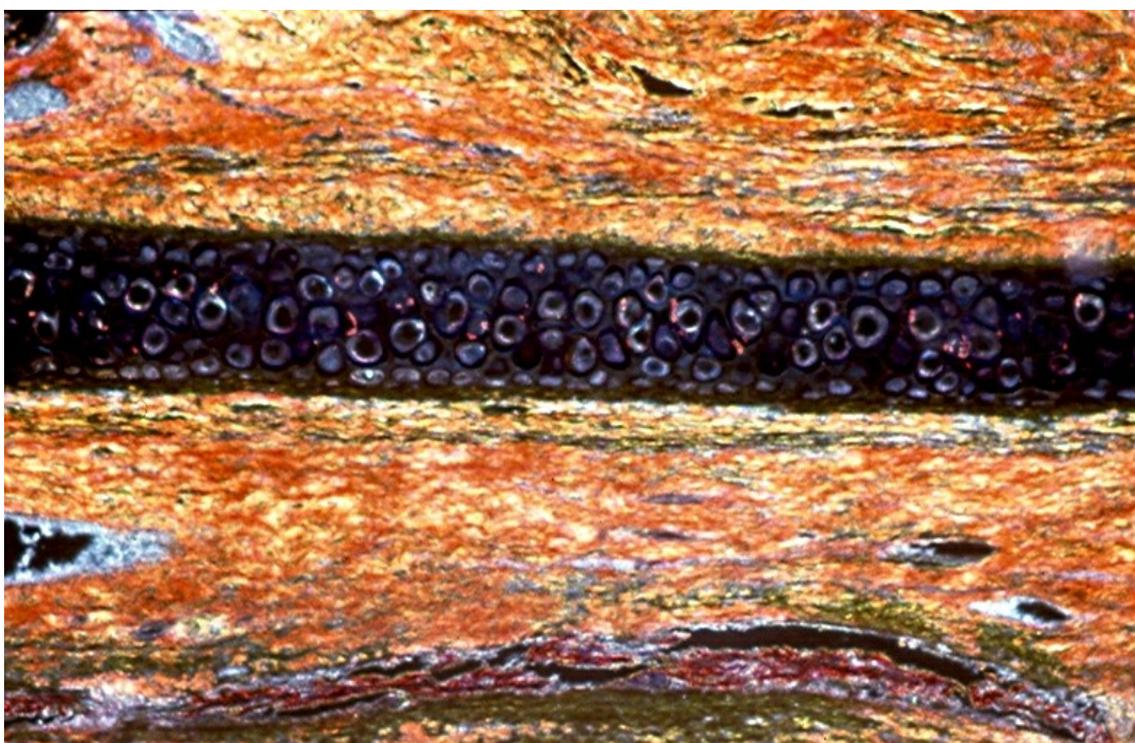


Fig. 27. Tinción rojo sirio defecto control, coloración amarillo anaranjado en el espesor de toda la herida, correspondiente a colágeno inmaduro (M.O, 100x).

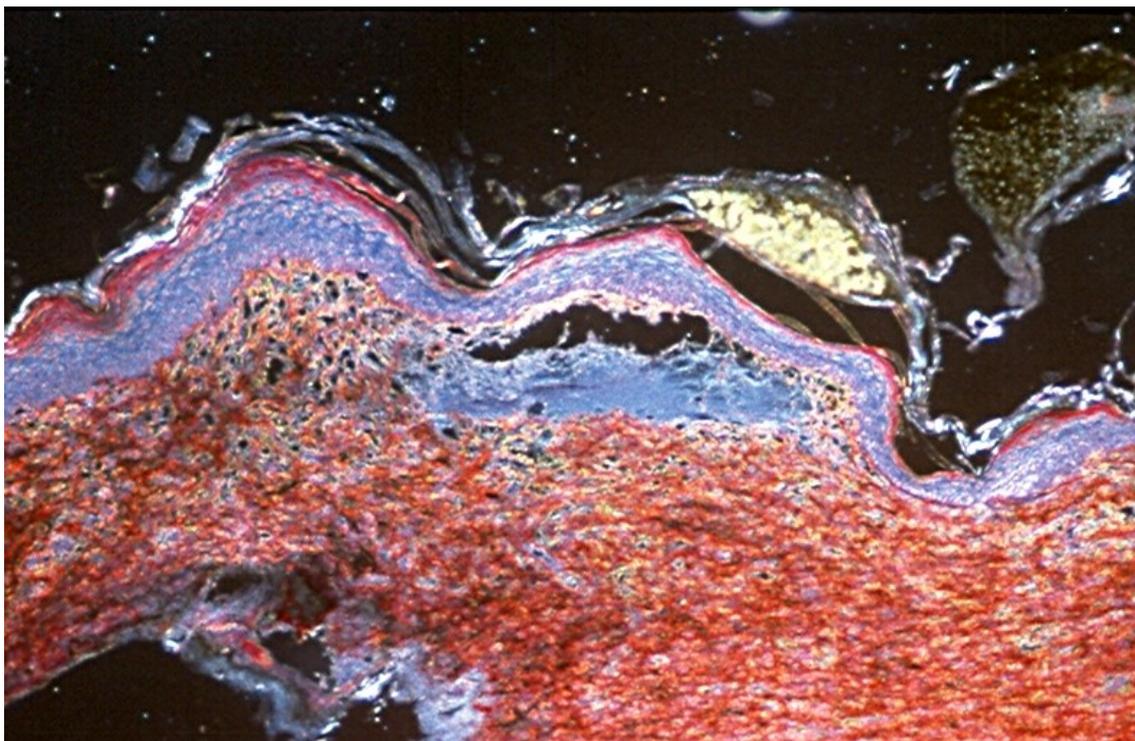


Fig. 28. Tinción rojo sirio defecto sometido a terapia celular, coloración roja en la zona correspondiente a la siembra indicando presencia de colágeno maduro (M.O 100x).

En los defectos sembrados con células madre, el marcaje rojo de las mismas con el trazador PKH-26 (Fig 29), nos permitió observar su evolución dentro de la herida; así pudimos distinguir bajo microscopía de fluorescencia, la perfecta delimitación de la zona sembrada (fluorescente) con la zona no sembrada (ausencia de fluorocromo) en estos defectos tratados (Fig. 30). Las células sembradas penetran en la herida (Fig. 31).

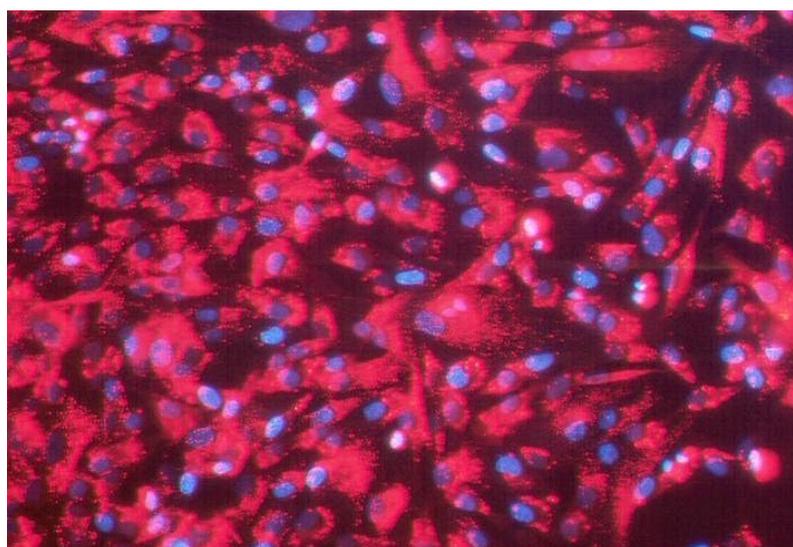


Fig. 29. Células madre marcadas con PKH 26 para su posterior siembra en los defectos (M.O 200 x).

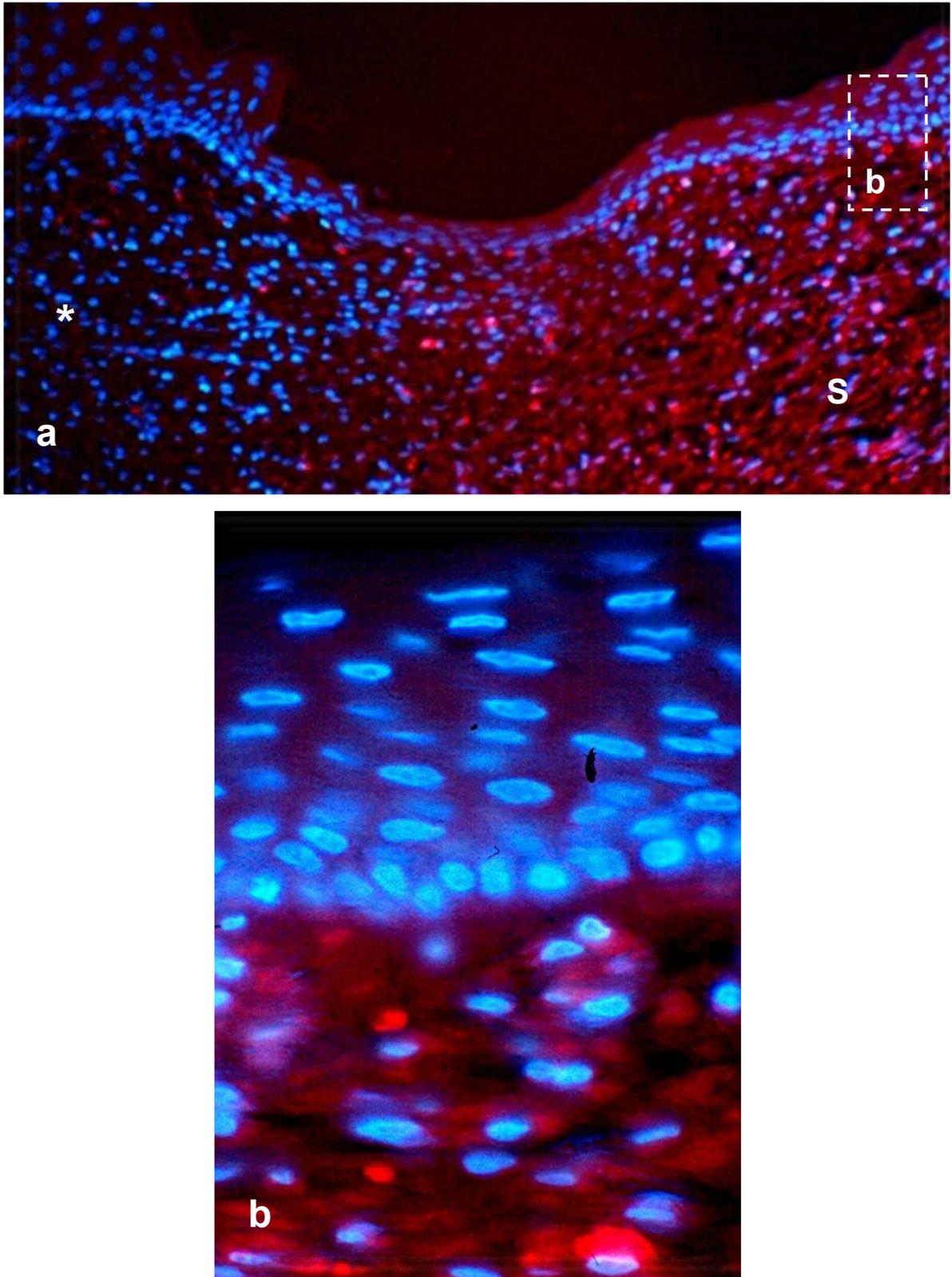


Fig. 30. a) Perfecta delimitación de las áreas no sembradas (*) que presentan ausencia de fluorocromo, y sembrada (S) donde se puede observar la presencia de células marcadas con PKH 26 (M.O, 100x). b) Mayor ampliación de la zona recuadrada en la imagen anterior (M.O, 400 x).

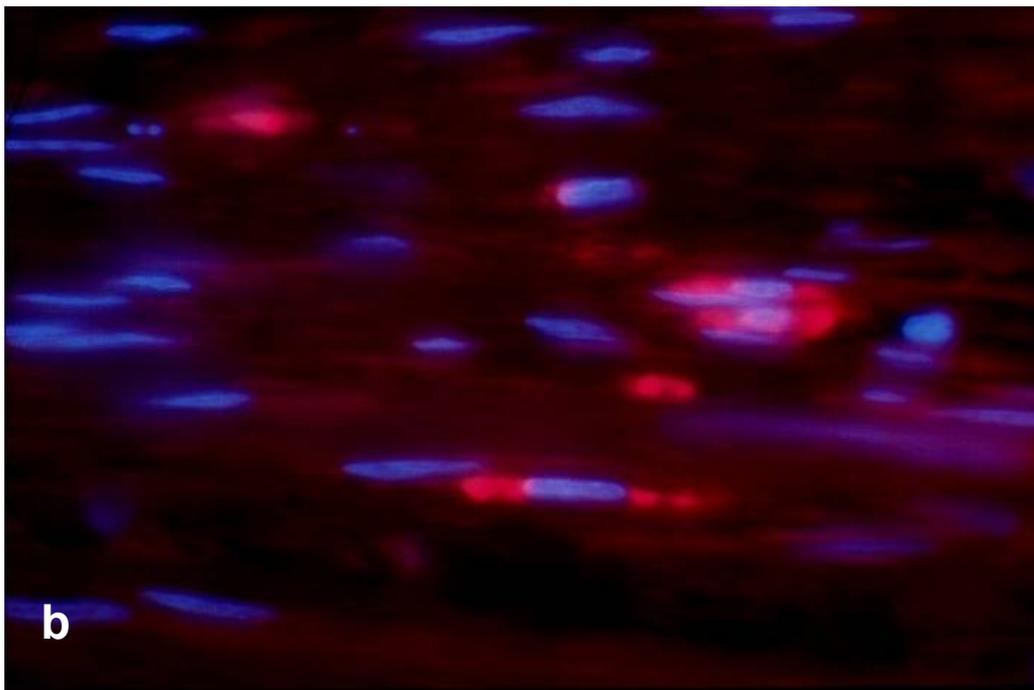
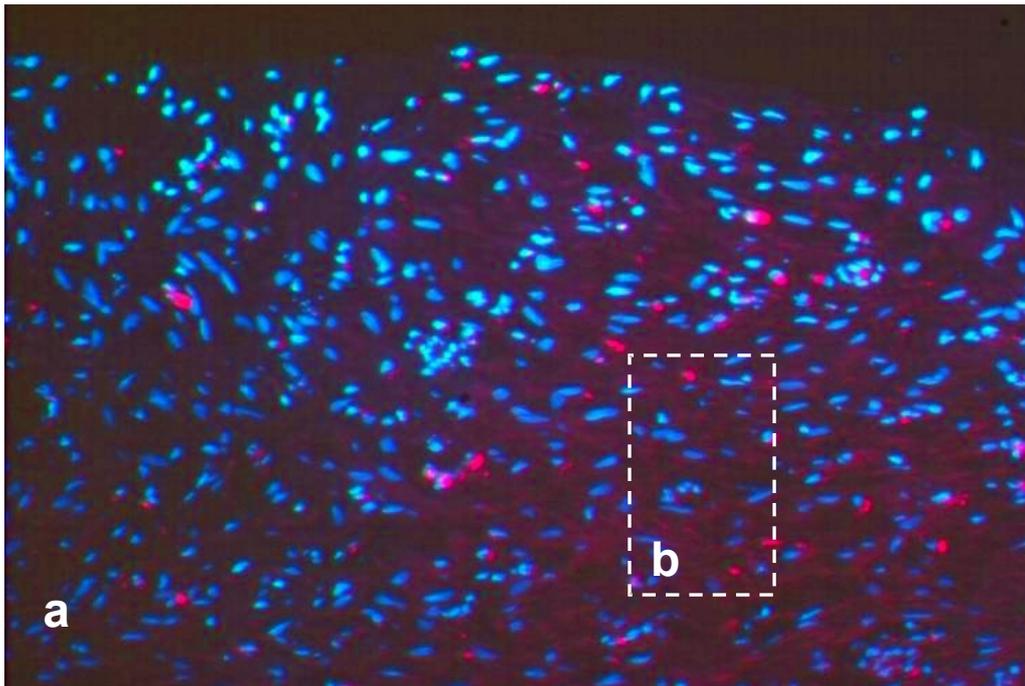


Fig. 31. a) Zona central de la herida correspondiente a la siembra con células madre. (M.O, 200 x). b) Detalle de las células sembradas. (M.O, 1000 x).

En presencia del sustrato sembrado se observó una superficie continua entre los bordes del defecto. Este sustrato favorece la proliferación y migración de las células desde los bordes sanos. Los queratinocitos migran sobre dicho sustrato y de forma centrípeta, hacia el centro del defecto (Fig. 32). Este fenómeno se corrobora perfectamente con la microscopía electrónica de barrido donde los queratinocitos de modo individualizado aparecen sobre el sustrato sembrado. Estas células han sido identificadas inmunohistoquímicamente utilizando citoqueratina 14 (Fig 33).

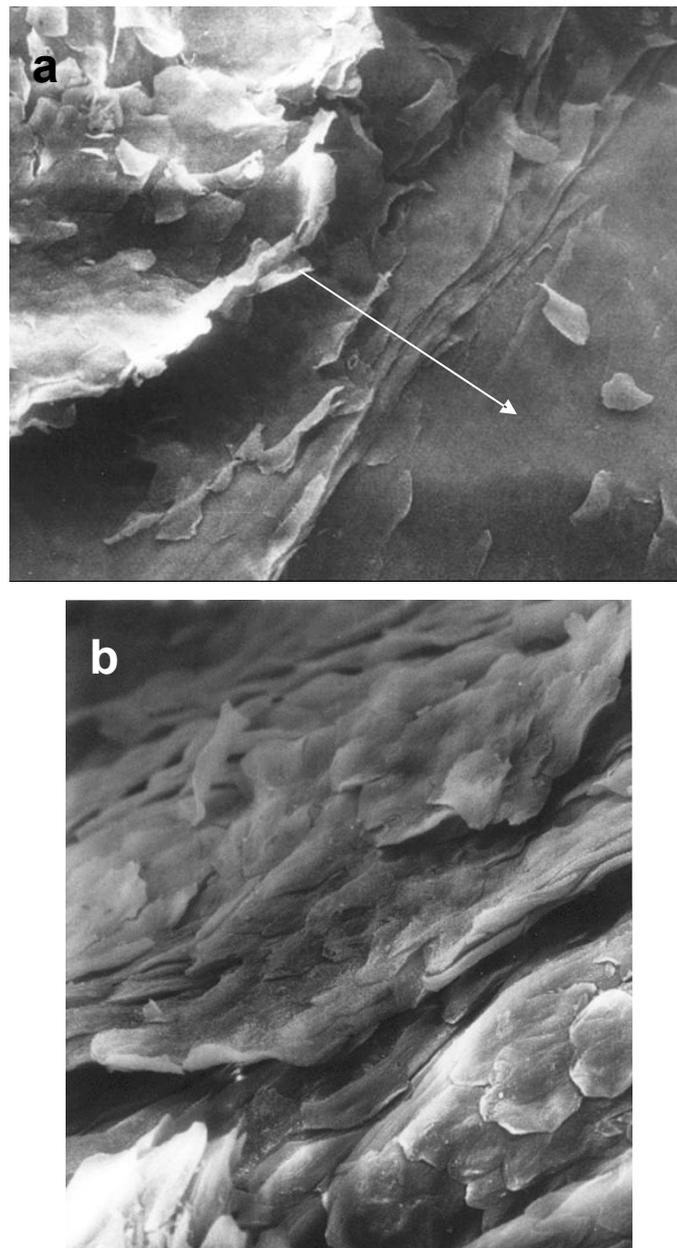


Fig. 32.a) Avance de la reepitelización a partir de los bordes sanos por delaminación de las células epiteliales que emigran de manera centrípeta (↓), favorecidas por la presencia del sustrato sembrado (MEB, 2000 x). b) Progreso de la reepitelización (MEB 5000 x).

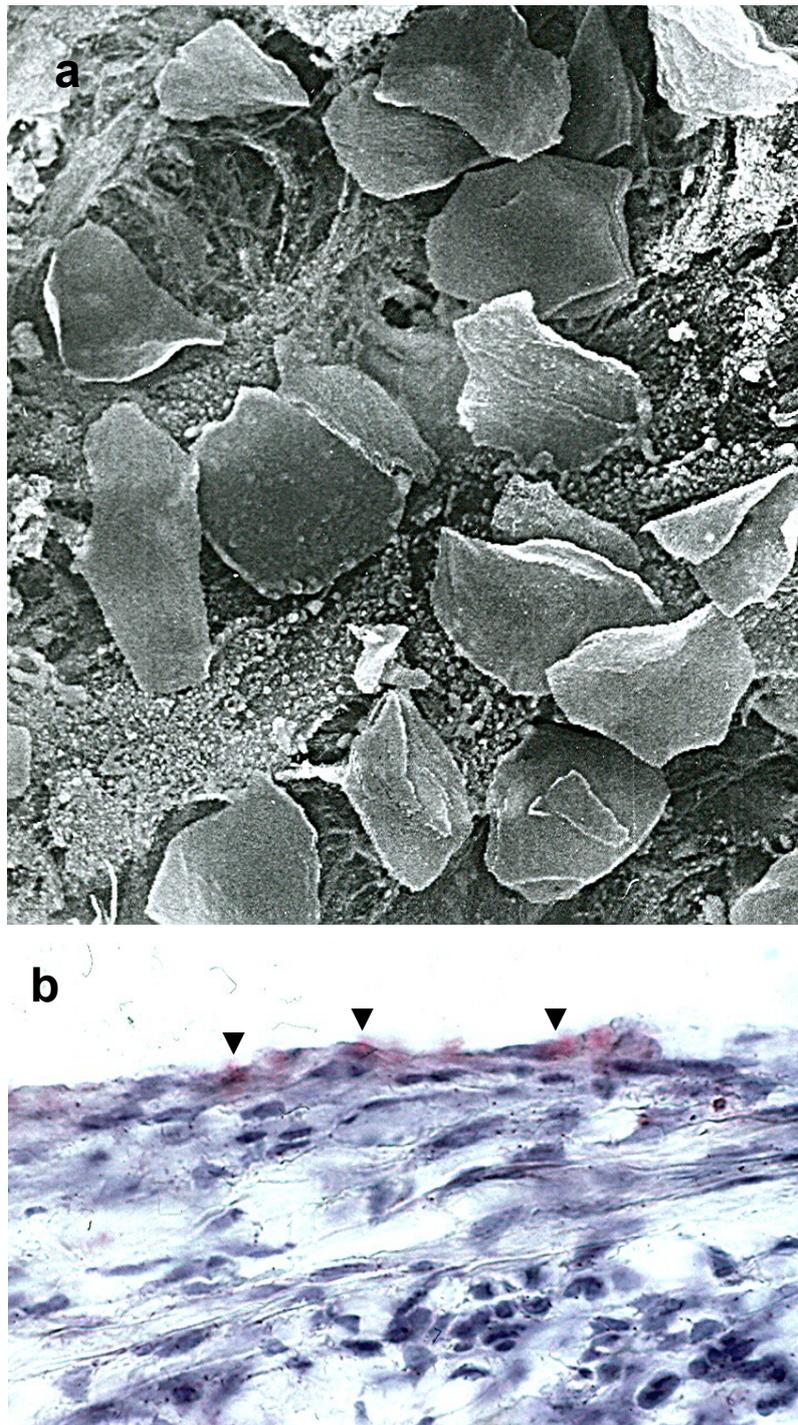


Fig. 33. a) Aspecto de los queratinocitos sobre el sustrato sembrado (MEB, 500x). b) Expresión de citoqueratina 14 en la zona sembrada (M.O, 630x)

Ultraestructuralmente, podemos observar como en los bordes del defecto estas células comienzan a formar una empalizada (Fig. 34), manteniendo aún características de células poco diferenciadas.

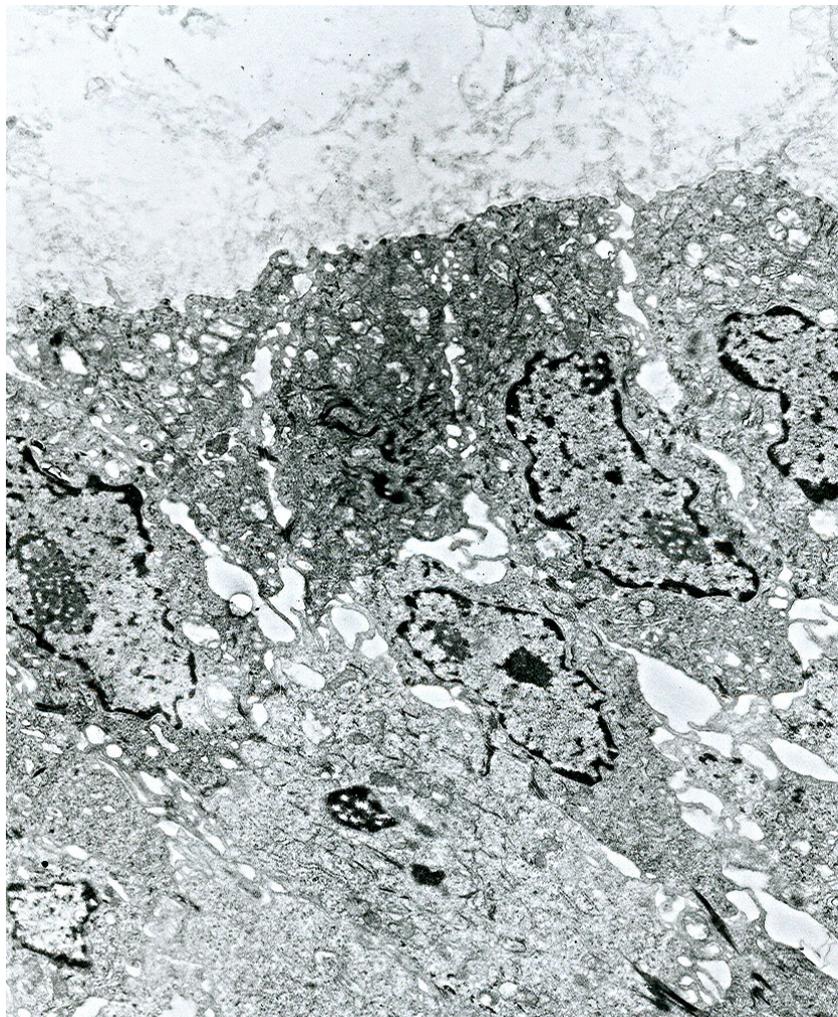


Fig. 34. Imagen ultraestructural, donde se observa como las células sembradas, comienzan la formación de una empalizada (MET, 3000X).

En las zonas centrales del defecto, donde todavía no existe un lecho epitelial continuo, se observan células que de modo individual se asientan sobre una matriz laxa rica en fibras de colágeno. En estas células pueden observarse distintas morfologías, pero todas ellas mantienen las características ultraestructurales de células poco diferenciadas (Figs. 35 y 36a). Con intensa actividad fagocítica (Fig. 36b), podemos encontrar células que en ocasiones se disponen formando un retículo o con numerosas prolongaciones y sinapsis (Fig. 37). En las zonas más profundas puede apreciarse la formación de yemas vasculares (Fig. 38).

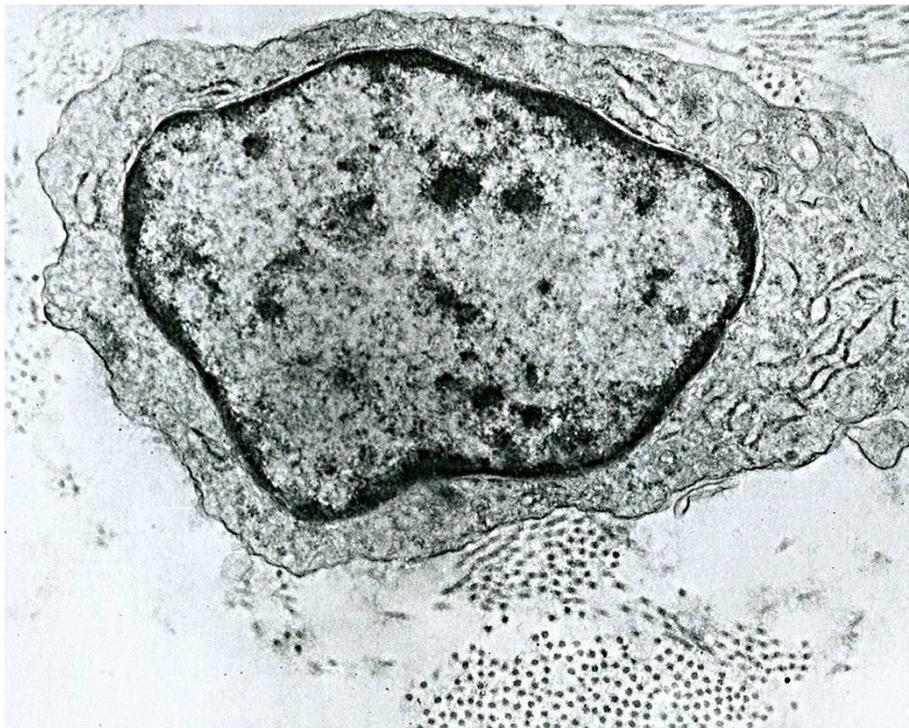


Fig. 35. Célula correspondiente a la zona sembrada mostrando características de célula poco diferenciada (MET, 12000 x).

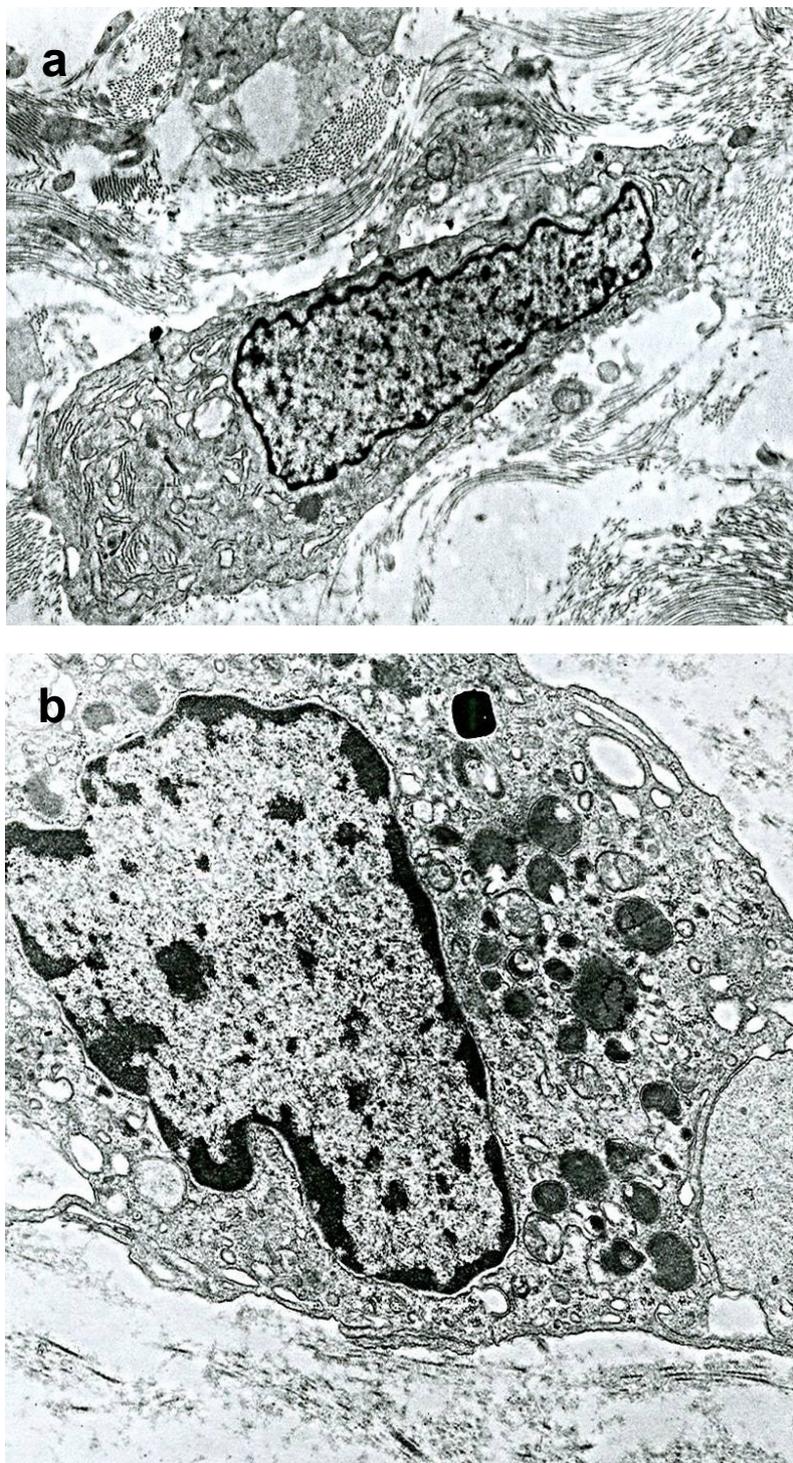


Fig. 36. a) Célula poco diferenciada en la zona central del defecto (MET, 7000 x). b) Célula con características macrofágicas (MET, 12000 x).

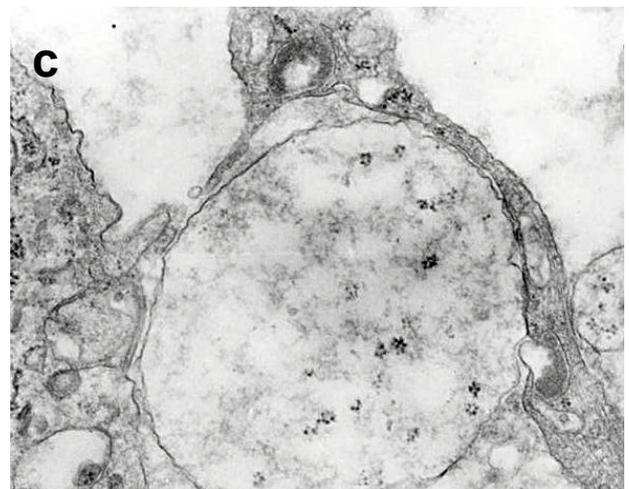
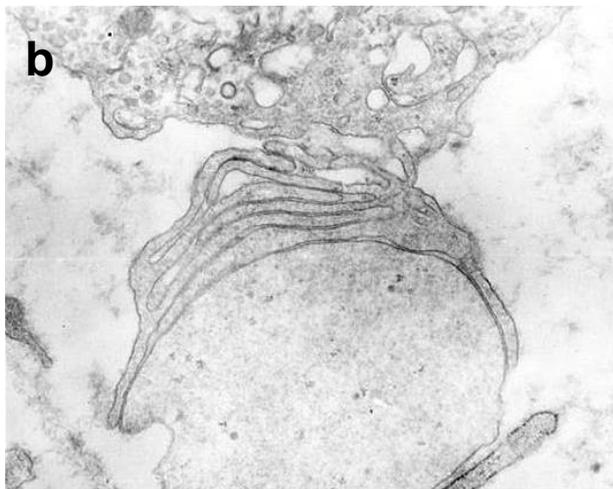
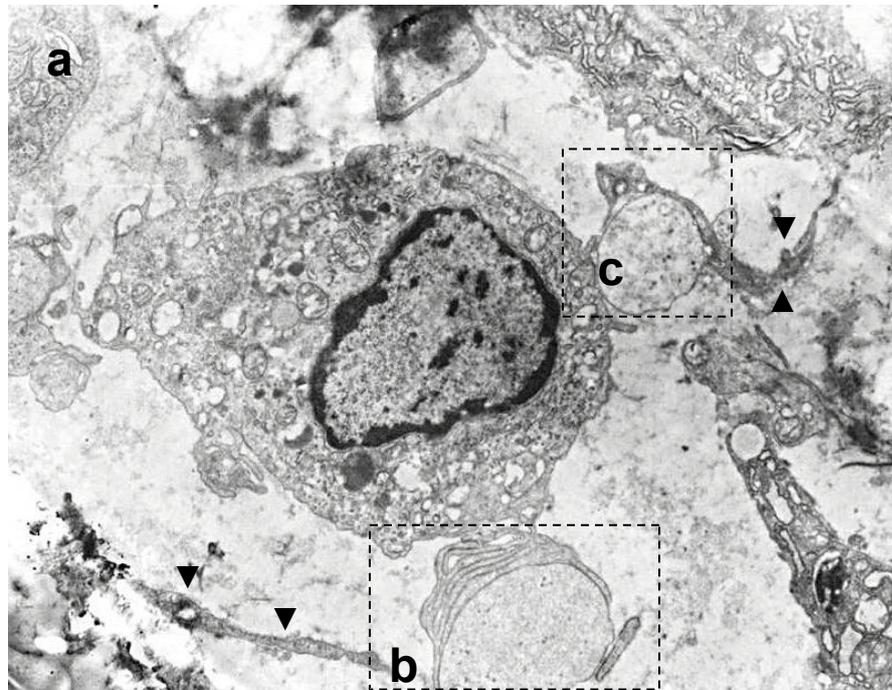


Fig. 37. a) Célula que en la zona sembrada presenta un retículo con numerosas prolongaciones y sinapsis (▼) (MET, 4400 x). b) y c) Detalles de las zonas recuadradas (MET, 12000 x y MET, 20000 x, respectivamente).

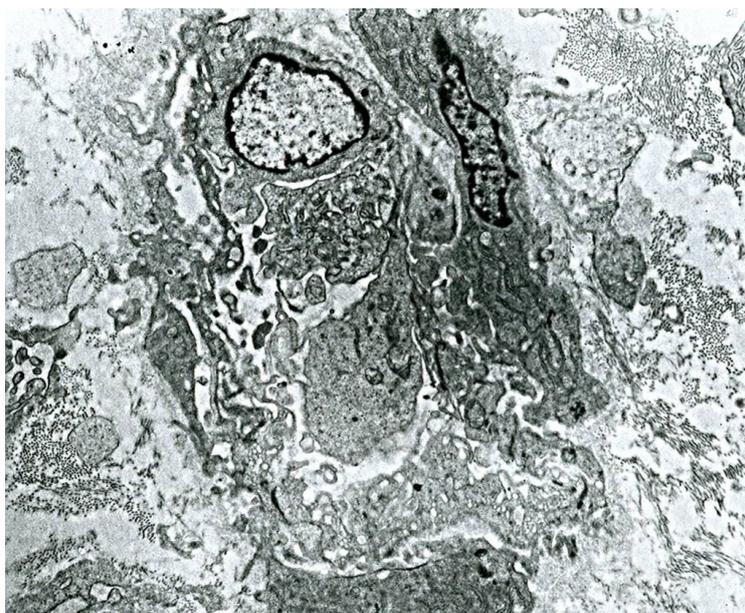


Fig. 38. Formación de una yema vascular en la zona profunda de la herida sembrada (MET 3000 x).

Estudios inmunohistoquímicos

El estudio inmunohistoquímico realizado sobre las muestras control y las sometidas a terapia celular, reveló en ambos casos una ausencia de expresión para vimentina (Fig. 39) y desmina, mientras que la expresión para α -actina, se localizaba sobre los vasos nativos en los dos grupos de estudio (Fig 40).

Se observó una mayor expresión de miosina en las muestras control, donde existe un patrón de distribución del marcaje en dos bandas: una superficial subepitelial, y otra profunda a nivel del cartílago en las muestras control, posiblemente correspondientes a zonas de mayor presencia de miofibroblastos y consecuentemente a áreas de contracción. En las heridas tratadas, la expresión para este anticuerpo, fue ostensiblemente menor y tan sólo existió un discreto inmunomarcaje en el área superficial y en los vasos nativos (Fig. 41), sin embargo, se producía una elevada expresión para fibronectina en este grupo, al igual que para M-cadherina (Figs. 42 y 43).

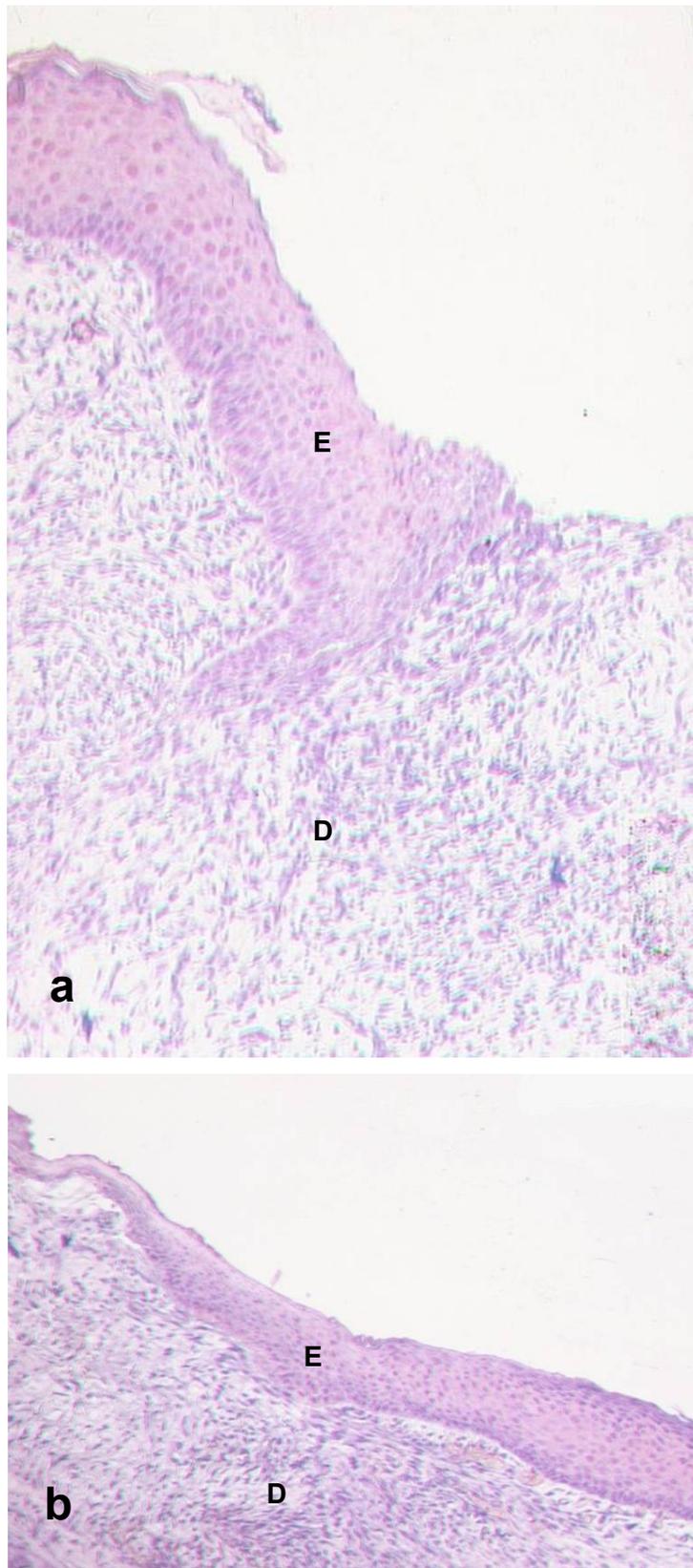


Fig. 39. Ausencia de expresión para la vimentina en ambos grupos de estudio. a) Herida control (M.O160 x). b) Defecto sembrado (M.O 100 x). E: epidermis, D: dermis.

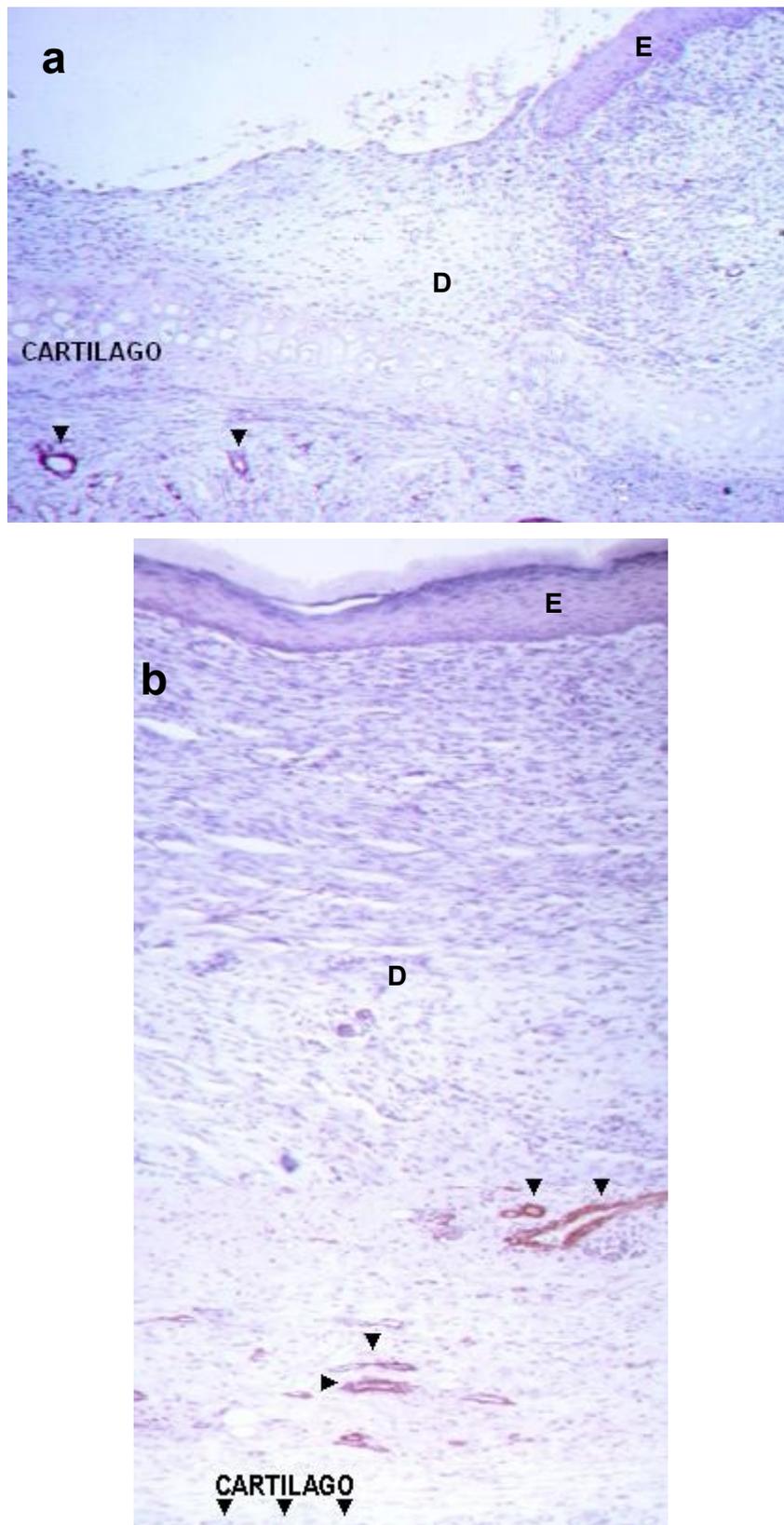


Fig. 40. La expresión para la α -actina, se localizaba en los vasos nativos en a) el grupo control (▼) (M.O), y b) en el grupo sembrado (▼) (M.O 200 x). E: epidermis, D: dermis.

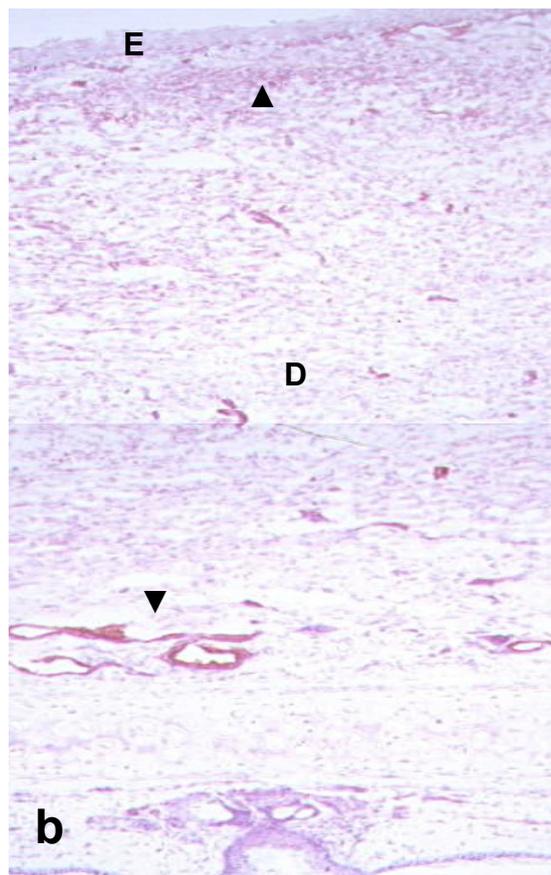
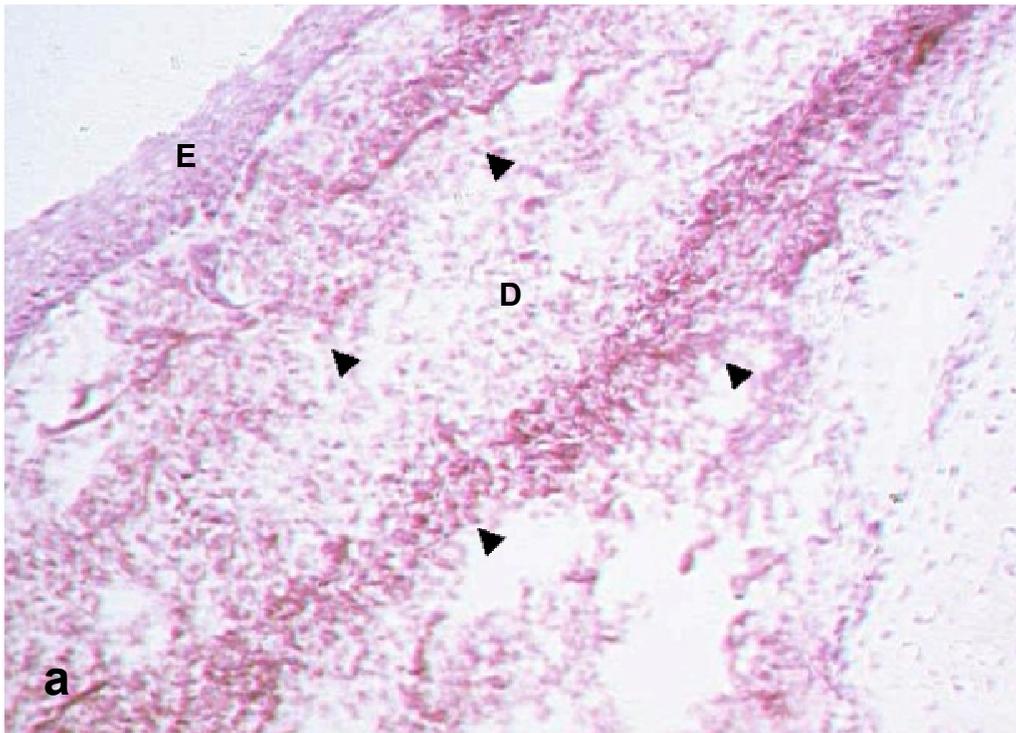


Fig. 41. a) Mayor expresión de miosina en el grupo control respecto al sembrado siguiendo un patrón en forma de bandas (▼) (M.O. 200 x). b) Expresión moderada de miosina en el área superficial del tejido en el grupo sembrado, y en los vasos nativos (▼) (M.O 100 x). E: epidermis, D: dermis.

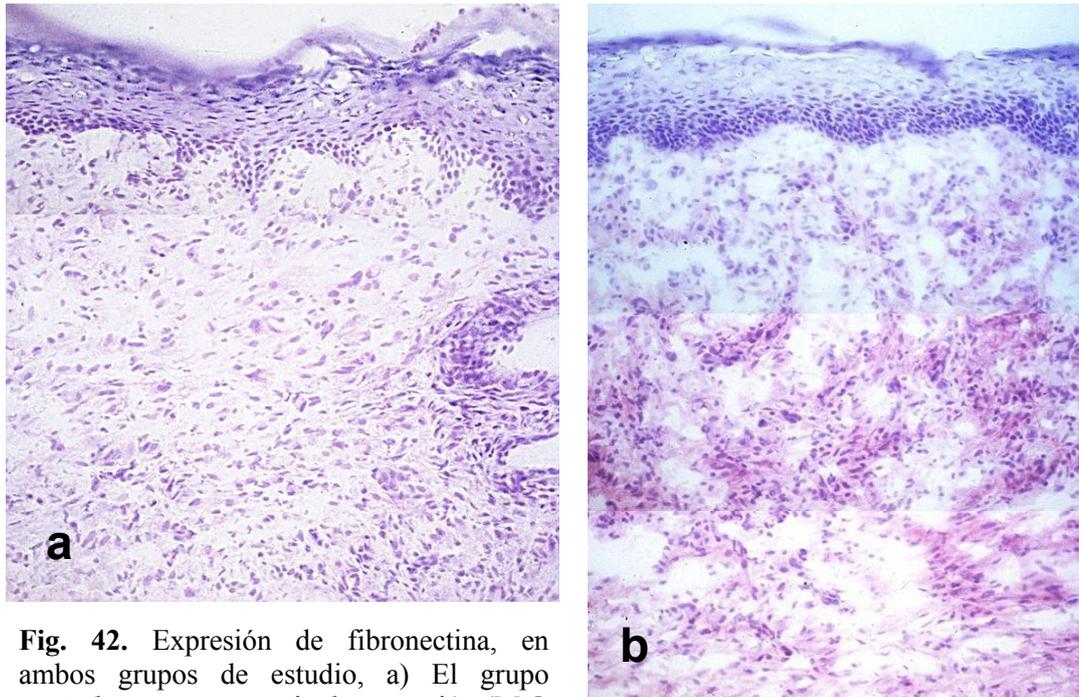


Fig. 42. Expresión de fibronectina, en ambos grupos de estudio, a) El grupo control muestra ausencia de expresión (M.O 200 x, y b) El grupo sembrado posee una expresión intensa (M.O 200 x).

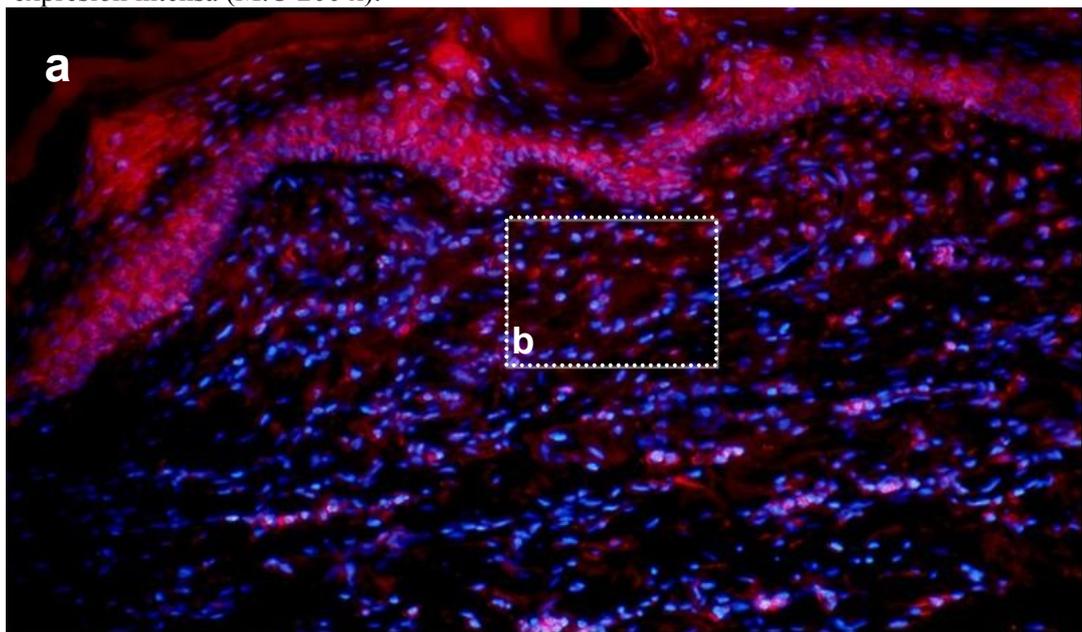
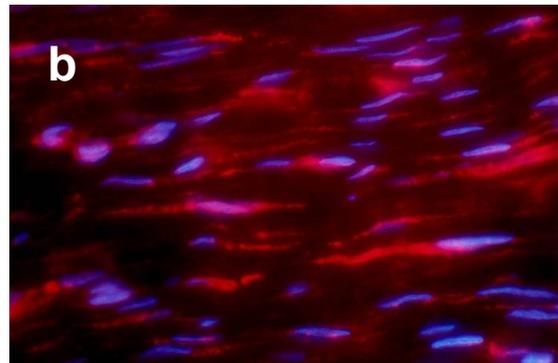


Fig. 43. a) En los defectos sembrados se observó marcaje para la M-Cadherina (M.O 200 x) y b) Detalle de la zona de expresión de este anticuerpo (M.O 1000 x). Por el contrario, las heridas control no mostraron expresión para este marcador.



0.2.3 DISCUSIÓN

Relevancia de la reparación de las heridas en la investigación médica.

La reparación de los tejidos no es una disciplina marginal en el ámbito de la investigación médica. Casi todas las enfermedades albergan durante su evolución procesos de reparación tisular. Cuando un tejido recibe una agresión sea ésta de naturaleza traumática, isquémica, tóxica, o autoinmune se ponen en marcha una serie de mecanismos de autodefensa que en conjunto integran la reparación tisular y que tienen como objetivo restaurar la integridad del tejido lesionado.

El encontrar alternativas terapéuticas que estimulen los procesos de reparación adquiere una singular importancia para la superación de múltiples patologías. El avance en el conocimiento de los eventos moleculares y celulares que acontecen en la cicatrización de las heridas, tiene mucha más relevancia de lo que “a priori” podemos sospechar y es que la reparación de una herida presenta múltiples similitudes biológicas (proliferación masiva de diferentes estirpes celulares, síntesis y depósito de proteínas de la matriz, neoangiogénesis, liberación explosiva de factores de crecimiento...) con numerosas patologías, como por ejemplo el cáncer. Otro de los atractivos de la cicatrización es precisamente éste, el avance en el conocimiento científico de la reparación de las lesiones cutáneas puede servir de “atajo” para el progreso en las soluciones terapéuticas de otras enfermedades.

La cicatrización de las heridas, supone un eslabón básico en el proceso curativo y la recuperación plena del estado de salud del paciente. El aumento de la edad media de la población, el auge experimentado por distintos procedimientos quirúrgicos en nuestros días, el mayor número de lesiones traumáticas accidentales y/o deportivas y la incidencia creciente de determinados estados patológicos, hacen que una adecuada cicatrización de las heridas de la piel sea clave en el desarrollo favorable de numerosos cuadros patológicos.

Una herida supone una pérdida de la barrera física que protege a los tejidos de la invasión de gérmenes y permite la pérdida de fluidos vitales, que puede ser dramática en los casos de pacientes con quemaduras. Se han descrito un gran número de complicaciones médicas o quirúrgicas que pueden ser atribuidas a deficiencias en la cicatrización de las heridas, existiendo un amplio abanico de enfermedades y entidades patológicas (insuficiencia venosa periférica, isquemia arterial, diabetes, cáncer,

inmunodepresión), que influyen de forma negativa sobre la reparación de las heridas, siendo la causa de una parte importante de la morbilidad e indirectamente, de la mortalidad, que encontramos a nivel hospitalario.

Mención especial merecen por su frecuencia y por el gran impacto sanitario y socioeconómico que acarrearán sus potenciales secuelas las úlceras por decúbito y/o vasculares. La mayor edad media de la población con una mayor prevalencia de ciertas enfermedades crónicas específicas y el encamamiento prolongado, ha disparado la incidencia de úlceras por decúbito. Lo mismo ha ocurrido con las úlceras vasculares. La insuficiencia venosa crónica acompañada de lesión cutánea asociada afecta a un 2% de la población, y la arteriosclerosis como enfermedad arterial oclusiva puede complicarse en un 5-10% con ulceraciones (Cairols, 2002).

El coste de estas afecciones es extraordinario para los sistemas de salud. Conseguir una reparación rápida y eficaz que permita integrar sin gran demora al paciente afecto de este tipo de heridas a su estado funcional previo, sobre todo en el contexto de determinadas patologías, sigue siendo una encrucijada sin resolver en la práctica médica.

Los tratamientos de estas lesiones que cicatrizan por segunda intención, a nivel local, se han basado en el uso de diferentes apósitos biológicos ó sintéticos casi siempre de tipo oclusivo con una acción específica para las úlceras dependiendo de la fase en que se encuentren (necrótica, con esfacelos, con tejido de granulación ó en fase de epitelización), y de que fueran más o menos exudativas, con resultados dispares en cuanto al resultado cicatricial. En los últimos años se han utilizado en clínica tanto geles (Regranex®) para mejorar la cicatrización, como factores de crecimiento, terapia génica y sucedáneos de la piel (Apligraf®) con células incorporadas en una matriz para tratar úlceras diabéticas y venosas (Veves y cols., 2001; Harding y cols., 2002; Thomas y Harding, 2002; Singer y Clark, 1999).

La epidermis cutánea ha sido el primer tejido vivo que ha podido ser reconstruido “*in vitro*” y asimismo utilizado para aplicaciones clínicas. Un desarrollo especial han adquirido las técnicas de cultivos celulares para crear sustitutos de piel que han evolucionado desde el uso inicial de sábanas de queratinocitos, hasta otros compuestos de queratinocitos, fibroblastos o ambos en el tratamiento de heridas agudas, crónicas, y quemaduras (Rue y cols., 1993; Otto y cols., 1995; Meana y cols., 1998).

Las células madre mesenquimales con fenotipo fibroblástico autólogas y alogénicas han mostrado eficacia en el tratamiento de animales afectados de quemaduras severas. En la clínica, los cultivos alogénicos de fibroblastos adultos humanos y de queratinocitos autólogos y alogénicos han sido utilizados sobre todo en pacientes con quemaduras. La dilatada experiencia en la utilización clínica de láminas de queratinocitos humanos (Gallico y cols., 1984; Compton y cols., 1989; Munster y cols., 1990) expandidas en cultivo a partir de una biopsia de piel, ha puesto de manifiesto sus principales limitaciones.

La primera de ellas es que la lámina de tejido que se obtiene es demasiado fina y frágil, lo que complica su manejo y favorece que se pierda parte de su área de superficie en su manipulación tanto en la preparación de la lámina para el trasplante, como en el transporte e implante de la misma. Además la adhesión de los queratinocitos al frasco de cultivo, hace que sea necesario un proceso de digestión enzimática para la separación de estas láminas, lo que dificulta la creación de una membrana basal adecuada una vez injertado el tejido (Lam y cols., 2002). Para que los queratinocitos lleguen a prender, es imprescindible que exista una fuerte unión dermoepidérmica. Los queratinocitos transplantados al lecho de la herida, deben ser capaces de generar una nueva membrana basal, semejante a la unión dermoepidérmica fisiológica y así, cubrir permanentemente esta superficie (Mommaas y cols., 1992).

Otro de los inconvenientes son los pobres resultados clínicos que se obtienen tras su trasplante referidos en diversos trabajos (Sheridan y Tomkins, 1995). El fenotipo celular que se desarrolla “*in vitro*” al carecer de la influencia del microambiente “*in vivo*” prescinde de la masiva inducción de señales moleculares e interacciones celulares que proporcionaría su presencia en el organismo. Además a causa de la rápida transformación de los fibroblastos en fibrocitos adoptando un estado biológico de crecimiento y actividad de proliferación menos pronunciado, se limita el potencial biológico de las células que posteriormente se implantarán “*in vivo*”.

Por otra parte con independencia de la mayor o menor eficacia obtenida con la aplicación de estas células, el análisis de los resultados muestra que el uso con estas técnicas de queratinocitos y fibroblastos es muy caro.

Para solventar estos inconvenientes, se han utilizado soportes de diversa naturaleza, sobre los que cultivar los queratinocitos e incluso, se han desarrollado diversos modelos de piel artificial completa cultivando queratinocitos sobre una superficie que imite y funcione como una auténtica dermis humana. Sin embargo el uso

de la mayoría de estos productos, está limitado nuevamente tanto por el alto coste de producción de este tipo de modelos de piel, lo cual limita su uso generalizado, como por la reducida capacidad de expansión de estos prototipos, que hace que no sean fácilmente aplicables en lesiones cutáneas muy extensas.

Todos estos inconvenientes condujeron a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para acelerar la reparación de las heridas.

Terapia con células madre

El encontrar estrategias terapéuticas que estimulen los procesos de reparación adquiere una singular importancia para la superación de múltiples patologías, y procesos fisiológicos, como la cicatrización de las heridas. Una vía seductora para abordar este problema sería utilizar SC aplicadas localmente en la secuencia concatenada de fenómenos que constituyen la reparación cutánea.

Las células pueden ser indiferenciadas (progenitoras, madre ó stem) ó diferenciadas (maduras). En la última década del siglo pasado, se produjo un incremento explosivo en nuestro conocimiento sobre la relevancia de las ESC en la fisiología tisular y se generaron numerosas expectativas acerca de su potencial para estimular la reparación. Sin embargo problemas éticos, jurídicos y legales de difícil solución, en la ausencia de leyes que permitan la utilización de las ESC, nos condujo en la práctica a un aparente callejón sin salida. Más recientemente la evidencia de que los compartimentos tisulares del adulto poseen SC contribuyó a desbloquear la situación previamente generada.

Sabemos que en los embriones la cicatrización de las heridas se caracteriza por una reparación perfecta. Increíblemente, hasta estadíos fetales tardíos no hay signos de fibrosis en el tejido neoformado. Numerosos estudios han comparado la reparación tisular de embriones y adultos, para buscar diferencias a nivel molecular que puedan explicar por qué esto es así (Yamasaki y cols., 1992; Ikari y cols., 1998). Algunas claves celulares y moleculares de la calidad del tejido neoformado en las heridas cutáneas del embrión son las siguientes: el estado de menor diferenciación de la piel fetal con unas SC más indiferenciadas que las del adulto, la mínima respuesta inflamatoria, la alta organización en el depósito de proteínas de la matriz (a diferencia de la reparación en las lesiones del adulto en la que la matriz de colágeno ha sido

pobrementemente reconstituida, en manojos paralelos y densos), así como el distinto perfil de FC y citocinas en la lesión embrionaria (sobre todo las responsables de la fibrosis, como el TGF- β , que se encuentran a niveles muy disminuidos).

Todo tejido consta de tres elementos fundamentales que sustentan su configuración: las distintas estirpes celulares, la matriz extracelular y las moléculas o moduladores biológicos, y desde los tres se articula la respuesta tisular a la lesión. El potencial para la regeneración de los tejidos depende del número de células progenitoras indiferenciadas presentes. Mientras que estas se hallan en muy alta proporción y en un estado de menor diferenciación en el embrión, son muy escasas en el adulto. Las ASC están situadas en localizaciones específicas de los compartimentos tisulares y su función es preservar la integridad del tejido mediante la reparación de cualquier daño que pueda sufrir. Poco sabemos todavía acerca del papel de las SC en la cicatrización. Sí se sabe que estas células ejercen una variada serie de funciones reguladoras del proceso de reparación, en virtud a su capacidad para inducir un amplio espectro de señales moleculares. Las SC, no parecen ser requeridas de forma obligatoria para iniciar la cicatrización, y de hecho, la reparación de las heridas puede progresar en la ausencia de ellas; sin embargo, la presencia de un sistema de células madre intacto, si parece esencial para conseguir un resultado con una buena calidad biológica.

La idea de utilizar SC en procesos de reparación tisular, está permitiendo plantear objetivos que hasta no hace mucho tiempo se consideraban inalcanzables. La aplicación de células madre, puede ser a priori una terapia particularmente útil en procesos de reparación tisular, dado su potencial biológico en condiciones fisiológicas. De hecho la utilización de SC portadores de citocinas, factores de crecimiento y otras proteínas capaces de desarrollar una determinada función biológica podría constituir en un plano teórico la mejor forma de terapia local para tratar una lesión.

Conforme se fue vislumbrando la certeza del importante protagonismo de las SC, surgió la tentación manifiesta de administrarlas de forma exógena para estimular la reparación. De hecho, esta línea de pensamiento ha llegado a constituir una de las vanguardias más prometedoras de la investigación médica actual, por la potencialidad de sus aplicaciones terapéuticas.

Enlazando con esta idea, aunque estamos en los inicios de esta terapia y no tenemos una perspectiva histórica todavía suficiente, la utilización de ciertas SC, sobre todo células madre mesenquimales de médula ósea y SC precursoras de estirpes endoteliales, para estimular la cicatrización de las heridas han ofrecido resultados

esperanzadores. Pero el potencial terapéutico de otras SC sigue siendo una incógnita. Un ejemplo de ello son las MDSC y su eventual aplicación en procesos de reparación. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la utilidad de las células madre musculares aplicadas como terapia celular, sobre un modelo experimental de defecto excisional cutáneo de espesor completo y su eficacia en la reparación y/o regeneración tisular, dada la particular ausencia de estudios experimentales con esta estirpe celular en la cicatrización de las heridas.

Fenómenos de contracción de la herida.

La cicatrización de heridas está bien caracterizada a nivel microscópico, pero no así a nivel molecular. Constituye un complejo proceso biológico que comprende la integración de diversos estadios tales como, la inflamación, la quimiotaxis y división celular, la angiogénesis, la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular, la contracción de la herida y la remodelación de la cicatriz (Bennet y Schultz, 1993a; Bennet y Schultz, 1993b). En las heridas que cicatrizan por segunda intención conforme avanza la reparación disminuye la superficie del área lesional. Hay tres procesos biológicos que evolucionan en paralelo y que al asociarse verifican este hallazgo morfológico: la neoformación dérmica, la reepitelización y los fenómenos de contracción de la herida.

La contracción de la herida reduce la superficie de la herida considerablemente, y conduce a que la zona de reparación incompleta se mantenga lo más reducida posible. Constituye un mecanismo de defensa rápida que se pone en marcha para favorecer el rápido cierre de la herida y evitar infecciones.

La retracción de las fibras colágenas sólo desempeña un papel secundario en la contracción de la herida. Los fibroblastos del tejido de granulación tienen una intervención mucho más decisiva en la contracción, pues ya en la fase de remodelación, una vez finalizan sus actividades de secreción se transforman en parte en fibrocitos (estado de reposo) y en parte en miofibroblastos, que al igual que las células musculares lisas contienen diversas proteínas musculares con capacidad para generar fuerzas contráctiles (Clark, 1996) que hagan posible la contracción de la herida (Berry y cols., 1998; Desmouliere y cols., 1993). Esta conversión es activada por FC tales como TGF- β 1 (Desmouliere y cols., 1993) y señales mecánicas relacionadas con las fuerzas que

resisten la contracción (Martin, 1997). Al contraerse los miofibroblastos, provocan que se tensen al mismo tiempo las fibras colágenas. El tejido cicatricial se retrae y de ese modo se astringe el tejido epitelial desde los bordes de la herida (Hartmann, 1999). Después del cierre de la herida los miofibroblastos revierten a una forma quiescente ó desarrollan apoptosis y desaparecen.

El aparato de microfilamentos de los miofibroblastos contiene proteínas con propiedades contráctiles: actina, miosina, y especialmente una isoforma de la actina típica de las células musculares lisas que se localizan en las paredes vasculares (α -actina de músculo liso; α -SMA). Sobre todo esta última es clave para la identificación de la estirpe miofibroblástica, constituyendo su más relevante marcador (El-Ghalbzouri y cols., 2004).

La contracción de una herida es un viejo recurso como mecanismo de supervivencia en la evolución de los animales. El proceso biológico de la contracción de una herida está muy extendido en los vertebrados superiores. La contracción del área lesional también ocurre en heridas humanas, pero tiene un menor impacto en comparación con lo que ocurre con otros mamíferos. En los mamíferos, la reducción de hasta un 90% del área lesional expuesta, se verifica gracias a los fenómenos de contracción de la herida, en cambio la contribución de estos fenómenos en las heridas humanas alcanza sólo entre el 25% y el 50 %.

En nuestro modelo, se determinó el porcentaje de contracción mediante análisis morfométrico computerizado. Fue significativamente superior en el grupo control que en el tratado ($50.83 \pm 12.84\%$ vs $22.25 \pm 9.56\%$; $p < 0.05$). Como mostramos en los resultados, el fenómeno de la contracción tras la terapia celular disminuye significativamente. Este hecho puede ser correlacionado con la disminución de la expresión de α -actina de músculo liso y miosina observada en el estudio inmunohistoquímico. Las células transplantadas en el área dérmica adoptan morfologías similares a las células del tejido de granulación, pero no son estimuladas a diferenciarse como miofibroblastos.

Hemos referido que la conversión de los fibroblastos en miofibroblastos es activada por ciertos FC (Desmoulière y cols., 1993) y señales mecánicas relacionadas con las fuerzas que resisten la contracción (Martin, 1997). El modelo de herida en oreja de conejo exhibe una contracción mínima de la herida debido a que el tejido dérmico de esta localización anatómica está fuertemente adherido al cartílago subyacente. De

hecho, está bien documentado que en esta localización, una herida de espesor completo cicatriza en más del 90% a expensas de la aparición del tejido de granulación y de la migración epitelial desde la periferia de la herida; siendo muy escasa la contribución de la contracción. Cuando un grupo de investigación ha querido analizar los eventos intra y extracelulares que actúan selectivamente en heridas de espesor completo con una mínima “interferencia” de los fenómenos de contracción ha escogido con frecuencia esta localización anatómica en la oreja del conejo. De esta forma conseguimos con el cartílago expuesto que el nuevo tejido de granulación se desarrolle únicamente a expensas de la periferia de la herida sin la participación de apéndices residuales ni de una eventual participación dérmica en el lecho de la lesión. Esto es importante porque reproduce lo que acontece con lesiones de tanta incidencia y en muchas ocasiones de tórpida evolución, como las úlceras de las piernas, que reparan casi por completo a expensas de la reepitelización y la formación del tejido de granulación con una mínima contracción (Ahn y Mustoe, 1990).

Pero podemos encontrar otras razones para explicar la atenuada importancia de los fenómenos de contracción en la oreja del conejo. Una lesión inicia una cascada de eventos celulares y moleculares. Es conocido el hecho de que la interacción de los fibroblastos dérmicos y los queratinocitos juegan un papel importante en la reparación cutánea. Últimamente se han elaborado hipótesis sobre la idea de que fibroblastos procedentes de tejidos diferentes a la dermis, por ejemplo, la grasa subcutánea, pueden también migrar dentro del área lesional y participar en los procesos de cicatrización. Existen pocos datos disponibles sobre el papel de células procedentes del tejido graso en la reparación cutánea. Las poblaciones celulares del tejido graso subcutáneo se ha comprobado en cultivo que son heterogéneas: están constituidas en un 60% de fibroblastos y en un 40% de miofibroblastos. Las poblaciones celulares procedentes de tejido dérmico presentan un porcentaje mucho más bajo de miofibroblastos (3 a 8 %). Las poblaciones procedentes de tejido graso presentan un rango de proliferación más bajo que las pertenecientes a la dermis. En cambio, con poblaciones celulares procedentes del tejido adiposo subcutáneo se obtuvo una marcada contracción de las matrices de colágeno sembradas con estas células, la cual apenas aparece cuando las matrices son pobladas por fibroblastos dérmicos. La presencia de los queratinocitos y los fibroblastos dérmicos parece jugar un papel en el traslado y consiguiente localización de los miofibroblastos en estudios “*in vitro*”. En estos modelos la migración de fibroblastos dérmicos es más lenta a través de la matriz que la de los fibroblastos

procedentes del tejido graso subcutáneo. Se puede especular con la idea de que la distancia entre los queratinocitos y los fibroblastos afecta a la mutua interacción celular entre ambas estirpes y que una diferencia en la presencia de estas células y/o en el espectro de secreción de factores liberados por estas células puede controlar esta migración (El-Ghalbzouri y cols., 2004).

Las mayores diferencias que generan las poblaciones celulares procedentes del tejido graso subcutáneo respecto a las que proceden de la dermis incluyen: la marcada contracción de la matriz dérmica, la disminuida migración epidérmica de queratinocitos, la alta expresión de queratina 17 indicadora de un incremento en la activación queratinocítica, el retraso en el depósito de colágeno IV en la unión dermoepidérmica, acumulación de células α -actina positivas sólo en las cercanías del compartimento epidérmico y la orientación de estas células siguiendo una orientación paralela al mismo. Los últimos dos fenómenos también han sido encontrados en la cicatrización cutánea migración (El-Ghalbzouri y cols., 2004).

Si extrapolamos a nuestro modelo estos hallazgos observaremos que se ajustan perfectamente a nuestros hallazgos histológicos y morfométricos. Con estas premisas podemos constatar una vez más en nuestro modelo al margen de la localización de las heridas en la oreja del conejo y sobre todo de la natural fijación del tejido dérmico al cartílago subyacente en esta ubicación, la ausencia de un tejido graso subcutáneo consistente con todas las connotaciones biológicas que implicaría, podrían aportar por una vía distinta explicación a la menor relevancia de la contracción en este modelo, ya que el efecto beneficioso que ejercería sobre la contracción de la herida la participación de poblaciones celulares procedentes del tejido adiposo subcutáneo no se obtendría.

Aún así en nuestra línea de investigación (Buján y cols., 2006), las heridas control presentan un fenómeno de contracción de mayor entidad que las heridas tratadas con MDSC. Hemos observado la presencia de abundantes células blancas en la orejas control, siendo estas posiblemente las que liberen factores no solo inductores de crecimiento y proliferación fibroblástica, sino también de diferenciación miofibroblástica. Por idénticas razones podría suceder que las MDSC liberen mediadores moleculares que inhiban la diferenciación a miofibroblastos; quizás este efecto juegue un papel importante. Por lo que la expresión y desarrollo de las funciones miofibroblásticas probablemente dependerían tanto de la estimulación producida por factores de crecimiento y otros mediadores moleculares liberados por las células del entorno perilesional, como de señales procedentes de la matriz extracelular.

Además si nuestro modelo mimetiza la reparación embrionaria al aplicar células indiferenciadas en el área lesional, podríamos favorecer la menor expresión de miofibroblastos y por consiguiente la menor contracción de la herida, porque en las heridas embrionarias no hay diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, quizás porque el embrión no precisa de este recurso debido a la perfecta calidad de su proceso reparador. En este contexto, los resultados obtenidos en cuanto a los fenómenos de contracción de la herida en nuestro estudio no deben extrañarnos.

El trabajo de la reepitelización de una herida se realiza más fácilmente gracias a la contracción subyacente del tejido conectivo, el cual “encoge” su tamaño para atraer los márgenes de la herida entre sí (Hartmann, 1999).

Una evidencia importante de los extraordinarios resultados obtenidos en cuanto a la reepitelización en nuestro modelo es constatar que al margen de la validez intrínseca de los datos procedentes del análisis computerizado del área epitelizada, estos se han alcanzado incluso con una contribución mínima de los fenómenos de contracción de la herida.

Neoformación de la dermis.

La cicatrización de heridas se realiza gracias a la formación de tejido de granulación y a la reepitelización (Slavin, 1996). La epitelización cierra el ciclo de regeneración de la herida y está íntimamente ligada con la formación del tejido de granulación. El tejido granular, puede ser descrito como una primitiva y transitoria unidad hística que cierra “definitivamente” la herida y sirve de “lecho” para la sucesiva epitelización. La denominación de “granulación” fue introducida por Billroth en 1865, y tal definición obedece, a que durante el desarrollo del tejido pueden visualizarse en la superficie pequeños gránulos rosados y vítreotransparentes (Hartmann, 1999).

Del tejido granular parten las señales quimiotácticas más relevantes, (factor de crecimiento queratinocítico, KGF), que actúan sobre los queratinocitos para que se inicie la migración de las células epiteliales desde los bordes de la herida (Nanney, 1990). Además la migración del epitelio de los bordes de la herida depende del tejido granular, ya que los epitelios no descienden, sino que necesitan una superficie deslizante lisa y húmeda (Hartmann, 1999). Nuestra línea de investigación refleja un índice de reepitelización nitidamente más alto en las heridas sembradas con MDSC que en las controles. De ahí que nuestros excepcionales resultados en cuanto a la reepitelización

del defecto de forma indirecta, impliquen un acelerado desarrollo de un tejido dérmico neoformado bien estructurado, que supone un indicio de la excelente calidad biológica de la reparación, sin el cual el fenómeno anterior no habría tenido lugar.

Neoangiogénesis.

El estudio inmunohistoquímico realizado sobre las muestras control y las sometidas a terapia celular, reveló en ambos casos una ausencia de expresión para vimentina y desmina, mientras que la expresión para α -actina se localizaba sobre los vasos nativos en los dos grupos de estudio.

La región central de una herida es hipóxica. La reparación de la herida no puede progresar sin nuevos vasos, ya que éstos deben garantizar un aporte adecuado de sangre, oxígeno y nutrientes (Hartmann, 1999), que permitirán avanzar a los procesos de reparación (Slavin, 1996). El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es esencial para la función normal de leucocitos y fibroblastos.

Una herida bien irrigada se encuentra extremadamente vascularizada. Incluso la permeabilidad de los nuevos capilares que se han formado es mucho más alta que la de los capilares normales, lo cual se debe al aumento del metabolismo en la región de la herida. Sin embargo los nuevos capilares tienen una menor capacidad de resistencia ante las sobrecargas producidas de forma mecánica. Con la posterior maduración del tejido granular que se transforma en tejido cicatricial, se reducirá nuevamente la densidad vascular (Hartmann, 1999).

En las regiones profundas el tejido neoformado de las heridas sembradas con MDSC está perfectamente organizado como un tejido conectivo altamente celular con buena vascularización, visualizada mediante la expresión de α -SMA. Si la mejor epitelización viene precedida de una adecuada y más rápida neoformación de un buen sustrato dérmico, uno de los factores implicados debe ser una eficaz angiogénesis que esté acelerada respecto a las heridas de los grupos control.

Los factores de crecimiento, las células inflamatorias, las células mesenquimales y las SC orquestan y modulan los procesos de reparación. A través de sucesivas divisiones de las células endoteliales se origina una figura canaliculada, la cual se vuelve a dividir en su extremo adquiriendo una forma de botón (Hartmann, 1999). Pequeños lazos capilares se forman y canalizan, permitiendo el flujo de la sangre (Slavin, 1996). Estos botones vasculares individuales crecen uno encima de otro y se

unen formando asas vasculares, que a su vez se seguirán ramificando, hasta que se topen con un vaso aún mayor en el que pueden finalmente desembocar. Recientemente se han descubierto en la sangre células germinales endoteliales, las cuales ponen en entredicho la doctrina vigente hasta ahora (Hartmann, 1999). En el año 2005 se describió por primera vez que ciertos precursores de células endoteliales, pueden ser aislados de la sangre periférica del adulto. Algunos trabajos recientes postulan la idea de que estos precursores endoteliales derivan de la médula en el adulto. Tepper y cols. demostraron que precursores endoteliales genéticamente marcados derivan completamente de la médula ósea transplantada, contribuyendo a la neovascularización de la herida.

De este modo la neoangiogénesis que aparece en respuesta al daño tisular, procede de uno de estos dos mecanismos potenciales: la angiogénesis o formación de nuevos vasos que se generan a partir de los ya existentes; o la vasculogénesis, es decir, la diferenciación de células endoteliales procedentes de precursores celulares que circulan en la sangre periférica. El microambiente local jugaría un papel crítico en la regulación funcional de los precursores endoteliales pero las últimas claves que confeccionan este proceso no son conocidas del todo. Las heridas, por ejemplo, alteran este microambiente originando la producción local de citoquinas y quimoquinas que proveen de mensajes que inducen la movilización de progenitores endoteliales desde la médula ósea y/o la circulación de precursores endoteliales residentes en el tejido para desplazarse a través del área dañada y efectuar la reparación vascular. En respuesta a los fenómenos isquémicos las quimoquinas activan el endotelio del tejido dañado y atraen precursores endoteliales que circulan por el torrente sanguíneo para adherirse al endotelio activado en el lugar de la lesión, proliferando en respuesta al ambiente hipóxico y generando la formación suplementaria de nuevos vasos sanguíneos (Tepper y cols., 2005).

Las células endoteliales deben aumentar asimismo la expresión de integrinas $\alpha v \beta 3$ si quieren responder a alguna señal angiogénica de la herida. Las integrinas $\alpha v \beta 3$ están expresadas transitoriamente en los extremos de los capilares en crecimiento del tejido de granulación, y la presencia de péptidos ó anticuerpos que bloqueen estas integrinas causan un fallo de la angiogénesis, y como resultado, una herida con un importante deterioro de su cicatrización (Clark y cols., 1996). Al igual que ocurre con las demás migraciones celulares en la herida, la morfogénesis capilar también depende de una severa regulación de la proteólisis de la matriz circundante durante la fase de invasión (Fisher y cols., 1994).

Hay además diversos factores de crecimiento como el TGF- β , que son importantes en la correcta maduración y remodelación vascular (Folkman y D'Amore, 1996).

Influencia del TGF- β

Si algún FC en particular puede ser denominado como “la hormona de la reparación”, ese es el TGF- β , que ejerce un papel crucial en el control de la cicatrización. El TGF- β 1 es una proteína pleiotrópica y multifuncional que induce diversos efectos sobre el crecimiento, metabolismo, locomoción, contractilidad y diferenciación celular (Bennet, 1993a). Numerosas evidencias indican que acelera la cicatrización de heridas, directa o indirectamente, estimulando el reclutamiento de células inflamatorias al espacio lesional, la síntesis y depósito de proteínas de la matriz por los fibroblastos, y la neoangiogénesis (Bennet, 1993b).

Los efectos del TGF- β sobre las distintas estirpes celulares dependen de su concentración en el medio extracelular. Ello también depende en cada caso de la presencia de otros FC o de la línea celular específica sobre la que actúa. En algunas circunstancias estimula la división celular y en otras la inhibe. A concentraciones bajas, este factor estimula la síntesis y la secreción del PDGF y, por tanto, favorece indirectamente la mitosis. A elevadas concentraciones, inhibe el crecimiento, debido a su capacidad para impedir la expresión de los receptores del PDGF (Bennet, 1993b). De hecho, una de las principales acciones del TGF- β es inhibir la proliferación celular (Massaguè, 1998). Este hecho ha originado que se postule, el que se puedan encontrar en lesiones cancerosas mutaciones en los receptores del TGF- β (DeGroot y Jameson, 2001). Debido a estas razones, diversos investigadores han otorgado al papel biológico del TGF- β 1 una singular importancia en el cáncer.

El TGF- β es pro-inflamatorio, estimulando la inmunidad no específica y la respuesta inmune inicial a un nuevo antígeno, pero es inmunosupresor si un antígeno ha sido reconocido previamente (Slavin, 1996). Estimula también la quimiotaxis de los fibroblastos y la producción de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. Asimismo el TGF- β inhibe la degradación del colágeno disminuyendo las metaloproteinasas y aumentando los inhibidores de las proteasas. Todas estas acciones favorecen la fibrogénesis, siendo el TGF- β pieza clave en el desarrollo de la fibrosis en varios procesos inflamatorios crónicos (Cotran y cols., 2000). Una excesiva producción de TGF- β puede precipitar la fibrosis tisular, y contribuir a la patogénesis de diversos

desórdenes fibróticos (Border y Nobel, 1994).

Tras el estímulo de TGF- β , los fibroblastos, que como hemos visto, son estimulados para sintetizar proteínas de la matriz extracelular sintetizan también más TGF- β , este exceso de TGF- β regula entonces negativamente los procesos inflamatorios a través de la inhibición de las funciones de las células inflamatorias activadas. El resultado normal es el cese de la inflamación. En ratones con deficiencia de TGF- β 1, no se da este último paso persistiendo en ellos una inflamación masiva (Letterio y cols., 1994).

“*In vitro*” comprobamos que las MDSC sintetizan y liberan TGF- β . La aplicación local de MDSC y la presencia de leucocitos (macrófagos activados) que observamos en las muestras, ejerce probablemente una importante inducción en la expresión de TGF- β (Gabbiani, 1998).

Proliferación celular

La proliferación celular es pieza clave en la reparación de las heridas con el fin de alcanzar la reconstitución del área dañada y de volver a rellenar la zona defectuosa mediante el tejido granular. Como expusimos en los resultados en las heridas tratadas el tejido neoformado obtenido presentaba abundante celularidad. La aplicación de MDSC promueve la proliferación celular facilitando una mayor actividad y presencia fibroblástica gracias a su capacidad para sintetizar TGF- β y probablemente otras citocinas y factores de crecimiento. La migración de fibroblastos y su ulterior proliferación es desencadenada sobre todo por TGF- β . Pero otro mecanismo que deriva en la mayor presencia celular respecto a los controles es el aporte de células “*per se*” que supone la administración de MDSC y su capacidad para diferenciarse acorde con el entorno celular que le rodea. Como podemos visualizar gracias al marcaje con PKH-26, las MDSC se localizan preferentemente en el tejido dérmico neoformado durante la cicatrización, apareciendo a niveles más bajos en las áreas epiteliales.

Depósito de proteínas de la matriz:

Muchos de los FC que regulan la proliferación de los fibroblastos, estimulan también la síntesis del colágeno (PDGF, FGF, TGF- β) (Pierce y cols., 1992). El factor

de crecimiento más importante que participa en la fibrosis en el área de la lesión es el TGF- β (Massagué, 1990).

La matriz extracelular (MEC) constituye el soporte de cualquier tejido. Durante muchos años se pensaba que la matriz sólo cumplía un papel básicamente estructural, en cambio en los últimos años se han acumulado evidencias de que tiene un papel mucho más activo en la reparación del que se le presuponía, ejerciendo una función clave en funciones biológicas dinámicas presentando receptores para moléculas específicas y para estructuras moleculares de la superficie celular. Gracias a ello sirve como reservorio de FC y otras moléculas biológicas. De hecho, la matriz gestiona la liberación de estos mediadores en respuesta a señales específicas (Yaszemski y cols., 2004).

Está siendo investigado con detalle el entresijo de mecanismos mediante los cuales las moléculas de la matriz extracelular regulan el comportamiento celular. Bissell y cols. en el 2005, propusieron el modelo de reciprocidad dinámica entre por un lado la MEC y por otro el citoesqueleto celular. En este modelo las moléculas de la MEC interactúan con receptores de la superficie celular a los que transmiten señales que a través de la membrana se transducen en mensajes intracitoplasmáticos; estas señales inician una cascada de eventos moleculares que por medio del citoesqueleto actúan sobre el núcleo, originando la expresión de genes específicos, cuyos productos retornan hacia la MEC a través de varias vías. Las interacciones célula-MEC participan directamente en promover la adhesión celular, migración, crecimiento, diferenciación y apoptosis a través de mediadores como las citocinas y los factores de crecimiento (Yaszemski y cols., 2004).

El defecto realizado en la oreja de las heridas tratadas con MDSC se recubrió con un lecho de fibrina para procurar sustento celular, procedente de la sangre del propio animal, sembrando a continuación células autólogas (4×10^6 células/defecto). El coágulo que constituirá un armazón básico para la formación del nuevo tejido cicatricial, proporciona una matriz provisional a través de la cual las células pueden migrar durante los procesos de reparación (Martin, 1997). En nuestro modelo, la siembra celular sobre el sustrato que proporciona el coágulo sanguíneo, permite que las células tengan un adecuado andamiaje que facilite su rápida integración, favoreciendo la reconstitución del tejido dañado y conformando el esquema biológico del futuro neot Tejido de granulación similar al nativo.

En nuestro tiempo de estudio la fibrina ha sido reemplazada por fibras de colágena perfectamente orientadas. Con la técnica de tinción rojo sirio, especialmente caracterizada para resaltar el colágeno, se aprecia nitidamente el incremento del depósito de colágeno en el grupo sembrado con células madre. En el microambiente celular de las MDSC gracias a sus propiedades biológicas se favorece el depósito de proteínas de la matriz (colágeno tipo I) altamente estructurado y organizado, y además en haces más densos, en comparación con las fibras colágenas más finas que encontramos en las heridas control. Las MDSC como comprobamos “*in vitro*” secretan y liberan TGF- β , el cual debido a sus propiedades biológicas puede jugar un papel clave en el adecuado depósito de las proteínas de la matriz en las heridas sembradas con SC de nuestro modelo. Una vez más en el espacio lesional las MDSC pueden mimetizar el estado embrionario en el cual, la alta organización en el depósito de proteínas de la matriz obtenida, se diferencia claramente de lo que acontece en la reparación de las lesiones del adulto en las cuales la matriz de colágeno ha sido pobremente reconstituida. La reorganización de estas fibras de una forma madura en cuanto a la composición de los diferentes tipos específicos de colágeno, y su disposición y orientación en la matriz, era también palpable.

En nuestro modelo la aparición de un neot Tejido conectivo de forma más acelerada que en las heridas no tratadas con MDSC permite una más rápida reepitelización; y ello implica no sólo un depósito más rápido de proteínas de la matriz, sino también una disposición madura de las mismas ya que sabemos que este efecto no sólo repercute en la cantidad de fibras de colágeno depositadas, sino en aportaciones cualitativamente interesantes como la disposición y el entrecruzamiento en forma de red de las fibras de colágeno. Esta evidencia es clave para la adecuada reestructuración de la matriz, con todas las connotaciones positivas que esto implica para la reparación, debido a las importantes funciones que desarrolla la MEC.

La aceleración del proceso de neoformación dérmica como hemos observado hasta ahora son un reflejo indirecto de numerosos fenómenos biológicos que actuando al unísono configuran un tejido con excelente calidad biológica: la aplicación de MDSC promueve la proliferación celular, la neoangiogénesis, y una rápida y madura neoformación de la matriz. De ahí que en nuestros resultados las heridas tratadas presenten en las regiones profundas un tejido conectivo neoformado perfectamente organizado, con buena vascularización y abundante celularidad.

Fibronectina

La expresión para la fibronectina se incrementó significativamente en el grupo sembrado. Este dato no puede quedar inadvertido en el contexto de la reparación. Los fibroblastos pueden usar una fibronectina que les conduzca como en una “tubería” dentro del coágulo; en este punto es interesante considerar que la variante de unión de fibronectina expresada por los fibroblastos y macrófagos en la superficie de la herida, es por otra parte específica a los lugares de migración de células embrionarias (Brown y cols., 1993), sugiriendo este hecho que esta fibronectina es un sustrato excepcionalmente bueno para la migración celular (Martin, 1997).

Llegados a este punto es digno de mención precisar que el TGF- β 1 estimula la síntesis de fibronectina (Balza y cols., 1988) y que una observación más reciente, muestra que parte de las acciones biológicas del TGF- β son mediadas a través de la porción ED-A de la fibronectina celular. Esta conclusión está basada en la observación de que anticuerpos específicos para la secuencia ED-A inhiben la acción del TGF- β en su función de inducir la expresión de mRNA, colágena y otras proteínas (Gabbiani, 1998).

Es decir, dos moléculas clave en la variada serie de moléculas que ahora predominan en el espacio lesional respecto a las que lo hacen en el estado tisular prelesional, potencian mutuamente sus funciones para obtener una adecuada evolución del proceso de reparación.

Reepitelización

La reepitelización se origina a partir de los apéndices de epidermis residual y de los epitelios de los márgenes laterales de la herida (Hartmann, 1999). Es un importante evento en el devenir de la cicatrización ya que involucra la proliferación y migración queratinocítica destinada a cubrir el tejido dérmico expuesto, e incorpora la restauración de una nueva membrana basal que gracias a sus características biomecánicas y estructurales proporciona la estabilidad necesaria para que el tejido cicatricial cumpla en lo sucesivo con los cometidos biológicos que se le asignen.

En nuestro estudio, se determinó el índice de reepitelización mediante análisis morfométrico computerizado. El área de reepitelización aumentó significativamente en el grupo tratado ($96.33 \pm 3.09\%$ vs $70.91 \pm 6.94\%$). El grupo control mostró áreas no epitelizadas y tejido de granulación con características inflamatorias.

Es más importante para una herida registrar mejores resultados en cuanto a la epitelización que en cuanto a la contracción, pues el primer fenómeno es más determinante para la adecuada calidad de la reparación, y porque una buena epitelización constituye un fin en si mismo, mientras que la contracción es un recurso biológico que actúa como medio para alcanzar este fin.

Los modelos de heridas excisionales de espesor completo presentan ciertas ventajas respecto a los modelos de heridas de espesor parcial ya que permiten obtener una adecuada cantidad de tejido neoformado suficiente para desarrollar los múltiples estudios histológicos, morfométricos e inmunohistoquímicos que se requieren para estudiar la calidad biológica del área lesionada. Además los modelos de heridas de espesor completo al involucrar la epidermis y toda la región dérmica, favorece el que la reepitelización sólo se realice desde los bordes de la herida y no del “pool” extra de células madre procedentes de los remanentes de folículos pilosebáceos que encontraríamos en la dermis reticular que aparece conservada en las heridas de espesor parcial, las cuales precipitan una proliferación explosiva de células epidérmicas y están consideradas las de mayor potencial proliferativo cutáneo. Investigaciones recientes en modelos de heridas excisionales de espesor completo han aclarado la localización y capacidad proliferativa de las células madre de la epidermis en los folículos pilosos (Rochat y cols., 1994), y en la propia capa basal de los queratinocitos. Este estallido proliferativo (Garlick y Taichman, 1994; Kidd y cols., 1971) aunque no es estrictamente requerido para la reepitelización, provee de un “pool” celular extra para reemplazar aquellas células perdidas durante la lesión (Martin, 1997). Por esta razón, si una herida de piel deja intactos los folículos pilosos, una gran contribución a la cicatrización de la epidermis, deriva de los remanentes de esos folículos pilosos. Estos actúan como un corte normal del borde epidérmico de la herida, y se extienden hacia fuera como islas crecientes desde las cepas foliculares. De hecho, la capacidad proliferativa de un pequeño fragmento de piel del adulto es inmensa; como ejemplo, tenemos la capacidad de los injertos autólogos de cultivos de queratinocitos para recuperar pacientes que han recibido quemaduras de espesor total en el 98% de su superficie corporal (Compton y cols., 1989). De ahí que los excelentes resultados encontrados en nuestro modelo sean sólo a expensas de la hilera delantera de queratinocitos de los bordes epidérmicos, sin recibir ninguna ayuda extra de ninguna otra área lesional.

La cicatrización hipertrófica ocurre de forma característica cuando acontece una herida de espesor completo con una respuesta cicatricial alterada. El desarrollo de esta

reparación anormal se ha asociado con un prolongado periodo entre la lesión y la reepitelización. Si la formación de un adecuado tejido dérmico se demora una de las consecuencias es un resultado patológico cicatricial que puede favorecer la aparición del queloide. Por eso nuestro modelo de herida en oreja de conejo también se ha utilizado cuando se quieren obtener cicatrices de heridas que histológicamente reproduzcan el aspecto de las cicatrices hipertróficas ya que el retraso en la reepitelización de la herida, como resultado de una limitada contracción de la misma, conduce a la larga al desarrollo de una cantidad excesiva de tejido de granulación y a una cicatriz hipertrófica después de completarse la reepitelización.

Interacción miofibroblástica-queratinocítica y fibroblástica-queratinocítica

Numerosos trabajos refieren la importante interacción biológica que existe entre dos estirpes celulares: la fibroblástica y la queratinocítica; pero la influencia mutua que ejercen entre sí los miofibroblastos y los queratinocitos, a pesar de que estas estirpes celulares coexisten durante la cicatrización, no está todavía clara. Asimismo, el papel específico de cada una de estos tipos celulares en la morfogénesis epidérmica permanece sin aclarar por completo.

Hay estudios que indican que tanto la presencia de miofibroblastos como la ausencia de una adecuada cantidad de células conducen a un retraso en la epitelización y en la generación de una nueva membrana basal, a diferencia de lo que ocurre con la presencia fibroblástica. Otros trabajos sugieren que los miofibroblastos no estimulan ni la proliferación ni la diferenciación queratinocítica. Pero parece más probable que los factores liberados por los miofibroblastos puedan favorecer la diferenciación epidérmica aunque no la migración queratinocítica (El-Ghalbzouri y cols., 2004). El microambiente celular local puede jugar un importante papel en el control de los procesos migratorios, el cual puede diferir según nos encontremos en situaciones “*in vitro*” o “*in vivo*”.

En cualquier caso estos indicios dan consistencia a la idea de que los miofibroblastos parecen tener un papel muy limitado en la reepitelización.

En diversos estudios, la presencia de miofibroblastos induce un retraso en la reepitelización y una epidermis desestructurada. Mediante modelos diseñados “*in vitro*” se aprecia que el depósito de las proteínas que configuran la membrana basal está retrasado cuando la dermis contiene miofibroblastos.

La membrana basal es una estructura altamente especializada localizada entre la dermis y la epidermis. Tanto los queratinocitos como los fibroblastos dérmicos contribuyen a configurar el componente proteico de la matriz. La membrana basal proporciona adhesión, restringe el tránsito de moléculas, permite la migración celular, y sirve de soporte a la epidermis. En los modelos que acabamos de mencionar, la presencia de diversos constituyentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno tipo IV, laminina y fibronectina, está disminuida o totalmente ausente en presencia de miofibroblastos en la dermis. Estos resultados sugieren que los miofibroblastos, a diferencia de los fibroblastos, no sólo no inducen la reepitelización sino que a la luz de resultados como los de nuestra memoria, y en relación con los que acabamos de referir, su baja expresión incluso podría favorecerla. En este contexto, la baja expresión miofibroblástica podría ser uno de los mecanismos que explicarían la excelente epitelización en nuestra línea de investigación.

Numerosos estudios refieren la importante interacción biológica que existe entre dos estirpes celulares: la fibroblástica y la queratinocítica para la formación de la membrana basal y la reepitelización de las heridas (Gabbiani, 1998). Una gran variedad de citocinas y FC son secretadas por queratinocitos y por fibroblastos, y tanto la concentración como el espectro de factores secretados por ambas puede ser modulado mediante su interacción mutua.

Todos estos datos confirman que los miofibroblastos de la herida difieren en sus funciones de los fibroblastos dérmicos, lo cual probablemente refleja el distinto patrón de citocinas y FC liberados por ambas estirpes celulares. De todos modos nos resta un gran trayecto por recorrer en el conocimiento de los factores secretados por los miofibroblastos, y de los efectos moduladores de los fibroblastos y los queratinocitos en esta función (Skalli y cols., 1986; Gabbiani y cols., 1981).

Es evidente que el mecanismo principal mediante el cual las MDSC ejecutan sus acciones es en gran parte debido a los mediadores moleculares que atesoran. Se empieza a conocer desde fechas muy recientes la “carga” biológica de ciertas SC, sobre todo en el caso de las SC de médula ósea y de las precursoras endoteliales, pero todavía no hay estudios que documenten con precisión el tipo de citocinas y FC que sintetizan y liberan las MDSC. En nuestra línea de investigación sí hemos constatado que “*in vitro*” las MDSC expresan TGF- β 1. Pues bien, el TGF- β 1, induce un incremento en el depósito de diversos constituyentes de la membrana basal favoreciendo la formación de una gruesa membrana basal y también estimula la diferenciación epidérmica.

La unión dermoepidérmica. Relevancia de las integrinas

En la piel normal, la capa basal de queratinocitos está fijada a una alfombra de matriz especializada, la membrana basal. La membrana basal ejerce sobre todo una influencia protectora para la integridad de la piel así como para el comportamiento queratinocítico y su proliferación, migración, y diferenciación (Yaszemski y cols, 2004).

Varios tipos de mediadores moleculares importantes están involucrados en interacciones intercelulares y célula-matriz. Entre estas moléculas una superfamilia de receptores transmembrana, las integrinas juegan un importante papel, no sólo como mecanismo de soporte y enlace sino también ejerciendo un control de la función y crecimiento queratinocíticos. Los receptores de membrana tipo integrina, se componen de subunidades proteicas α y β y participan en procesos de adhesión celular, siendo fundamentales a la hora de transducir las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular en ciertas respuestas celulares, que inducen bien proliferación o bien diferenciación. Las integrinas también participan en la formación de los hemidesmosomas así como en la transducción intracelular de señales moleculares, y están directamente asociadas con módulos de tirosina cinasa en la membrana celular. Los primeros contactos de fijación de los queratinocitos son los hemidesmosomas, los cuales enlazan con la laminina de la membrana basal a través de las integrinas $\alpha 6 \beta 4$ y tienen vínculos intracelulares con la red del citoesqueleto de queratina (Martin, 1997).

En la actualidad, a diferencia de lo que se creía, sabemos que los primeros movimientos tisulares de epitelización comienzan ya algunas horas después de producirse la lesión; las uniones de hemidesmosomas de las células epidérmicas situadas inmediatamente adyacentes a los márgenes de la herida, tienen que ser disueltas en orden a alcanzar un sostén sobre la matriz provisional de la herida y desplazarse sobre la dermis subyacente a ella (Breuss y cols., 1995; Haapasalmi y cols., 1996; Grinnell, 1992) , y los primeros queratinocitos de los bordes de la herida tienen que expresar nuevas integrinas, principalmente los receptores de la fibronectina/tenascina $\alpha 5 \beta 1$ y $\alpha 5 \beta 6$ y el receptor de la vitronectina $\alpha 5 \beta 5$, y relocalizar los receptores de colágeno $\alpha 2 \beta 1$, en orden a alcanzar un sostén sobre la matriz provisional de la herida y desplazarse sobre la dermis subyacente a ella (Breuss y cols., 1995; Haapasalmi y cols., 1996).

Las células de la capa basal epidérmica poseen un marcado e ilimitado potencial mitótico, que se encuentra normalmente restringido por represores moleculares específicos del tejido. Al producirse una lesión de la epidermis, desciende el nivel extracelular de los mismos y aumenta la actividad mitótica de las células del estrato basal gracias al estímulo proporcionado por diversos FC (KGF, EGF), y da comienzo la multiplicación celular necesaria para llevar a cabo el relleno de la zona defectuosa (Hartmann, 1999). En este sentido, la función que desempeña la integrina $\beta 1$ en todos estos procesos celulares, se ha documentado ampliamente tomando como ejemplo precisamente su papel en la diferenciación de los queratinocitos a partir de las SC del estrato basal de la epidermis. Estas células madre, darán origen a los queratinocitos maduros, que conforme se van diferenciando y alcanzan el estrato córneo, muestran menor expresión de integrina $\beta 1$. Además se ha observado, que los queratinocitos humanos que se unen rápido al colágeno IV, tienen alto potencial proliferativo, mientras que los que se adhieren lentamente, experimentan divisiones previas para dar una progenie terminalmente diferenciada, por lo que se deduce que los queratinocitos de rápida adherencia, se comportan como células madre, mientras que si son de adherencia lenta, se comportan como células aceleradoras de tránsito (Janes y cols., 2002). Esta faceta aparece de igual forma, tanto si las células se testan directamente tras aislarse de la epidermis, como si han estado en cultivo (Jones, 1995b; Jones y cols., 1993). No obstante, estos hallazgos, están en desacuerdo con los de otros autores que llegaron demostraron que la regulación de la diferenciación terminal es independiente de la adhesión mediada por la integrina $\beta 1$ (Levy y cols., 2000). En un futuro próximo reuniremos más evidencias que nos ayuden a dilucidar el papel exacto de la integrina $\beta 1$ en estos procesos.

A los 5 días nuestras células en cultivo son negativas para la integrina $\beta 1$, mientras que a los 14 días la población adherente la expresa en cultivo. Con este hallazgo podríamos entender mejor la fácil integración y migración de las MDSC en el lecho de la úlcera y en la unión dermoepidérmica neoformada, pues en estas localizaciones las células sembradas interaccionarían fácilmente de múltiples formas con otras células y con la matriz, gracias a la versatilidad de acciones de la integrina $\beta 1$.

La formación de una adecuada unión dermoepidérmica en nuestro trabajo probablemente ha favorecido el cometido que pretendíamos, y es crítica para el éxito de un determinado diseño experimental en el marco de la cicatrización y de hecho su

alterada restauración condiciona la eficacia del mismo, y es una de las dificultades con que se encuentran los injertos de piel para cumplir su cometido. Una membrana basal bien estructurada supone “hilar fino” en la reconstitución histológica que pretendemos y en la recuperación de la homeostasis del estado cutáneo prelesional, y es una muestra de la calidad biológica del modelo empleado.

Migración epidérmica

La migración celular supone el avance de las células en dirección al borde contrapuesto de la herida (Nanney, 1990). También la migración celular presenta sus peculiaridades. En tanto que durante la maduración fisiológica de la epidermis, las células migran desde la capa basal hacia la superficie de la piel, el reemplazo reparativo de células se realiza mediante el avance de las células en línea recta hacia los bordes contrapuestos de la herida. La migración de las células periféricas de la epidermis no se produce de manera uniforme e incesante, sino más bien paso a paso, dependiendo del eventual estado en que se encuentre la granulación de la herida. La epitelización desde el borde de la herida comienza ya con la rotura de la continuidad de la epidermis. Las células epiteliales emiten prolongaciones citoplasmáticas formando lamelópodos, lo cual les permite el deslizamiento por medio de activos movimientos ameboides hasta encontrarse unas frente a otras y de ese modo proceden a cicatrizar el defecto (Nanney, 1990). Este proceder sin embargo sólo llega a hacerse efectivo si se ha generado previamente un buen sustrato dérmico. Como hemos reflejado anteriormente la rápida epitelización de nuestro modelo lleva asociada una excelente neoformación dérmica. Por estas razones la epitelización es tan importante, porque nunca supone un hecho histológico aislado ya que aglutina inherente a ella una adecuada asociación de otros procesos.

Así como los queratinocitos de los bordes de la herida tienen que ajustar las integrinas de su superficie antes de migrar, la locomoción delantera involucra la contracción de los filamentos de actomiosina intracelular que se insertan dentro de los nuevos complejos de adhesión (Mitchison y Cramer, 1996). Esta reestructuración de los receptores de integrinas y la reunión y asociación de la red de filamentos de actina, puede servir para justificar el retraso de varias horas antes de que comience la migración epidérmica (Grinell, 1992). El TGF- β 1 y algunas citocinas proinflamatorias parece que estimulan la expresión de algunas de las subunidades de integrinas que facilitan la

migración de los queratinocitos (Gaillet y cols., 1994). Por este mecanismo de nuevo el TGF- β 1 puede también coadyuvar en la cicatrización.

Aunque el citoesqueleto de actina es clave para la motilidad y desplazamiento de los queratinocitos adultos y el cierre de la bolsa de las heridas epidérmicas embrionarias, puede ser factible que la red del citoesqueleto de queratina, fuera un suministro tisular y celular esencial de fuerza, durante tales vigorosos movimientos epiteliales (Martin, 1997). De hecho, en ratones con una delección del gen que codifica el antígeno penfigoide ampolloso (BPAG1), el cual media la unión entre los filamentos de queratina y las integrinas α 6 β 4 de los hemidesmosomas, las heridas incisionales no son capaces de reepitelizar (Guo y cols., 1995). Algunas queratinas pueden jugar bastante más que un sutil papel que proporcione simplemente fuerza celular. Como con las integrinas (Hertle y cols., 1992), la queratina que está normalmente restringida a la capa basal, aparece suprabasalmente en queratinocitos de los márgenes de la herida. Los filamentos cortos de queratina 6, 16 y 17, son también inducidos, y aparecen para ayudar a la retracción de otras queratinas celulares en el interior de agregados yuxt nucleares, dentro de los cuales, colaboran activamente en el desplazamiento celular (Paladini y cols., 1996). Las queratinas pueden ser menos importantes en el embrión. En embriones de ratón que carecen de queratina 8 y supuestamente sin filamentos de queratina, la reepitelización de una herida parece realizarse exactamente como en un embrión normal, sugiriendo este hecho que la epidermis del embrión no precisa el soporte de estos filamentos intermediarios durante el proceso de reparación (Brock y cols., 1996).

Todas estas modificaciones conducen la migración de los primeros queratinocitos; hay evidencias recientes que provienen de un modelo organotípico de cicatrización de heridas, en el que los queratinocitos son marcados genéticamente con retrovirus, que sugieren que la migración no es a expensas únicamente de las células basales, sino que las células suprabasales pueden también “saltar” sobre las células basales (Garlick y Taichman, 1994). Otra evidencia de que los queratinocitos suprabasales del borde de la herida pueden ser capaces de algo más que una diferenciación terminal, proviene de la atípica expresión de integrinas que presentan, que en la piel normal, están restringidas a la capa proliferativa basal (Hertle y cols., 1992).

El punto final de la reepitelización

Cuando la superficie desnuda de la herida ha sido cubierta por una monocapa de queratinocitos, la migración epidérmica cesa, y una nueva epidermis estratificada con una membrana basal subyacente es reestablecida desde los márgenes internos de la herida (Clark, 1996). A la primera preformación del epitelio periférico le sigue una fase de engrosamiento del estrato epitelial, que al principio es de una sola capa, y que se lleva a cabo a través de la superposición de las células. Por lo demás, las capas epiteliales que en breve estarán formadas por múltiples estratos volverán a recuperar su grosor y capacidad de resistencia (Hartmann, 1999).

Las células suprabasales cesan la expresión de integrinas, y la queratina basal, en cambio, sufre la programada diferenciación “standard” de las células en las capas externas de la epidermis (Martin, 1997). Coincidiendo con la síntesis de la membrana basal finaliza la expresión de las MPPs, y se vuelven a instaurar las uniones de hemidesmosomas a la membrana basal (Martin, 1997). Las biopsias de piel cicatrizada con injertos de cultivos de queratinocitos sobre heridas, sugieren, que los últimos componentes de la maquinaria de uniones de la epidermis en alcanzar la madurez, son las fijaciones que vinculan la membrana basal al tejido conjuntivo subyacente (Compton y cols., 1989).

Sabemos poco acerca de las señales que paralizan la proliferación de los queratinocitos, excepto que incluyen, probablemente, el desprenderse mediante inhibición por contacto a través de señales mecánicas (Martin, 1997). Este comportamiento se aprecia nítidamente en los estudios con microscopía (scanning) de nuestro modelo. Aunque sólo escogimos un tiempo de estudio podíamos observar ya en él que la reepitelización estaba formada por lengüetas epidérmicas de células fusiformes que se extendían por el área del defecto y que enviaban emisarios (queratinocitos aislados en scanning) para colonizar las áreas que quedaban por cubrir, lo cual constituía el preludio de un inminente final de la epitelización.

Consideraciones sobre otros modelos experimentales semejantes

Recientes hallazgos sugieren que las células derivadas de médula ósea pueden contribuir al mantenimiento de la integridad tisular (Borue y cols., 2004). Los estudios sobre el uso de células madre derivadas de la médula ósea (Bone marrow derived stem cell, BMDSC) para el tratamiento de órganos y tejidos dañados está siendo llevado a la

práctica desde fechas muy recientes. Gracias a trabajos realizados en los últimos años sobre la plasticidad de las BMDSC, es concebible que podamos generar con su utilización nuevas células cutáneas (Bianco y cols., 2001; Krause y cols., 2001; Pittenger y cols., 1999; Jiang y cols., 2002 c). Hay trabajos que describen el uso satisfactorio de las mismas en el tratamiento de heridas crónicas con dificultades para cicatrizar (Badiavas y Falanga, 2003). Así se ha observado que la terapia con SC en pacientes con quemaduras promueve la regeneración de la herida y la recuperación del paciente reduciendo su mortalidad (Rasulov y cols., 2005).

Se ha comprobado que bajo ciertas condiciones de cultivo las BMDSC pueden no sólo dividirse sino también prediferenciarse en células de otros tejidos, incluyendo células con fenotipo fibroblástico. La aplicación de SC mesenquimales de médula ósea alogénicas con fenotipo similar al fibroblasto (Fibroblast like mesenchymal stem cells, FMSC) acelera en pacientes con quemaduras la recuperación de la homeostasis y promueve la cicatrización de las heridas. Activa la angiogénesis, y acelera la epitelización de los márgenes de la herida reduciéndose el riesgo de cicatrices hipertróficas; en comparación con los injertos de piel, la aplicación de FMSC alogénicas permite que la reconstitución cutánea se alcance con mayor celeridad y con buenos resultados biológicos (Rasulov y cols., 2005), con un diseño de un modelo cicatricial menos complejo y de más fácil manejo que la fragilidad inherente a las láminas de injerto cutáneo.

En nuestro modelo al igual que en el de las heridas crónicas se busca verificar una cicatrización por segunda intención. Las células mesenquimales ocupan la dermis cutánea, y ciertas evidencias sugieren que en las heridas crónicas presentan un fenotipo alterado y/o senescente (Mendez y cols., 1998; Vande Berg, y cols., 1998). En líneas experimentales en las que se aplican BMDSC en este tipo de lesiones, se apreciaba un significativo crecimiento en el espesor de la piel en las heridas tratadas, así como un incremento de la vascularización del lecho de la úlcera y del área circundante. En ellos clínicamente se observa que la aplicación de SC derivadas de médula ósea en las heridas parecen integrarse y actuar preferentemente en la dermis. Posiblemente, la incorporación de SC de médula ósea da lugar a células dérmicas carentes del fenotipo alterado, anteriormente mencionado, observado en heridas con dificultades para cicatrizar. Es decir, en relación con estos hallazgos la aplicación de SC derivadas de la médula ósea sería especialmente útil para proporcionar regeneración dérmica en el lecho de una herida con su cicatrización alterada (Badiavas y Falanga, 2003).

Como los procesos de neoformación dérmica preceden a una completa reepitelización, es probable que las SC orienten su potencial biológico preferentemente a la reconstrucción de un sustrato dérmico con buena calidad biológica, como ocurre con nuestro modelo.

Pero otros estudios muestran que la aplicación de células derivadas de la médula ósea (BMDSC) en heridas que cicatrizan por segunda intención favorece preferentemente la unión epitelial y el recubrimiento epidérmico de la dermis desnuda (Borue y cols., 2004). Estos estudios muestran que la piel lesionada altera el grado de diferenciación de las BMDSC hacia un fenotipo queratinocítico y al modo en el que se desarrolla su ciclo celular. En ausencia de lesión las BMDSC se integran en una pequeña proporción ($\leq 1\%$) como queratinocitos en la piel, mientras que el análisis de la reparación cutánea mostró que la aplicación de BMDSC, y su integración como células epidérmicas en el área de la herida, era significativamente mayor que en la piel intacta en el mismo periodo de tiempo. Las SC epidérmicas juegan un papel significativo en la homeostasis cutánea, y en la reparación de las heridas en respuesta al daño epidérmico estas SC migran, proliferan, y se diferencian tanto en células epiteliales de la matriz dérmica, las cuales forman el folículo pilosebáceo como en queratinocitos cornificados los cuales forman la piel. En estos estudios la avidez por integrarse en la región epitelial puede explicarse observando que una significativa correlación entre áreas conocidas por presentar altos niveles de proliferación celular sugiere que las BMDSC se acomodan preferentemente en regiones con alta capacidad de proliferación. Así las células epiteliales derivadas de la médula ósea se ubicaban sobre todo en regiones como los bordes de la herida inmediatamente adyacentes al espacio lesional, localización donde las células epiteliales habitualmente experimentan una intensa proliferación.

Probablemente la interacción entre los distintos compartimentos celulares, los diferentes tipos de lesión, los subtipos de células indiferenciadas implicados, y las complejas señales moleculares del microambiente lesional orientan en un sentido u otro las funciones biológicas de las SC y su diferente ubicación en el tejido lesionado (Borue y cols., 2004).

Hay trabajos que han ideado modelos para estimular la cicatrización mediante la utilización de los mismos recursos biológicos con los que cuenta la piel para reparar, es decir, aplicando SC dérmicas ó epiteliales. Hay evidencias de que la dermis contiene

múltiples células multipotenciales. Las células dérmicas multipotenciales muestran similitudes con las SC mesenquimales de la médula ósea en cuanto a sus propiedades biológicas. En cultivo, tras veinte pases tienen capacidad para diferenciarse y formar células con fenotipo característico de osteocitos, adipocitos, condrocitos y neuronas. Las SC obtenidas de la dermis han mostrado capacidad para diferenciarse y formar células con fenotipo característico para producir tejido neural así como derivados mesodérmicos (osteocitos, adipocitos, condrocitos) (Toma y cols., 2001; Shi y Cheng, 2001; Young y cols., 2001b). En diversos trabajos las células dérmicas multipotenciales mejoran la reparación de heridas de piel tras su aplicación tópica (Shi y Cheng, 2003 a). Incluso administradas de forma intravenosa en modelos comprometidos (ratas sometidas a radiación subletal con un defecto cutáneo excisional en el dorso) (Shi y Cheng, 2003b) tras ser cultivadas, Shi y cols., 2004, comprobaron que aceleran la cicatrización mejorando tanto la reconstitución dérmica como epidérmica. Estas células vehiculizadas por la sangre periférica eran capaces de integrarse y diferenciarse en células dérmicas cutáneas y en células mesenquimales de la médula ósea. Se ha comprobado que pueden liberar una variada serie de citocinas y factores de crecimiento (IL-3, IL-6, IL-15, VEGF, TGF- β , PDGF), así como fibronectina, que posiblemente regulan sus funciones biológicas. Estos datos son elocuentes para constatar tanto el potencial de las células dérmicas como su versatilidad para colonizar tejidos lesionados en localizaciones distintas aún en un estado inmunocomprometido (Shi y cols., 2004).

La capa epidérmica cutánea constituye después de la médula ósea y el epitelio intestinal el tejido con mayor capacidad proliferativa a expensas de las células epidérmicas multipotenciales del estrato basal.

El futuro prometedor de las células madre.

Nuestros conocimientos sobre las funciones de las SC están aumentando considerablemente. La homeostasis de múltiples tejidos involucra la participación activa de las SC. La organogénesis o la formación de un tejido precisan del crecimiento y desarrollo del mismo a partir de SC específicas de ese tejido. Gracias a las células madre las líneas maestras que conducen a la confección de un plan biológico orgánico básico con la participación concomitante de diversos órganos, podrían ser trazadas con detalle.

Trabajos muy recientes nos describen la extraordinaria plasticidad y versatilidad de las células madre para integrarse en tejidos afectados de muy variadas patologías, lo cual permite mostrarnos nuevos horizontes en el tratamiento de numerosas enfermedades. En ellos las SC multipotenciales de los tejidos adultos han mostrado un extraordinario potencial terapéutico para ser utilizadas en medicina regenerativa (Verfaillie, 2002; Caplan y Bruder, 2001).

Recientes hallazgos indican que la médula ósea contiene SC con un potencial intacto para diferenciarse dentro de una amplia variedad de tejidos, incluyendo tejido hepático, muscular, óseo, vascular y cutáneo (Badiavas y Falanga, 2003). En estos estudios, las BMDSC muestran una gran contribución bajo condiciones patológicas en la reparación tisular. En trabajos sobre el infarto agudo de miocardio, las BMDSC se incorporan al tejido adquiriendo el fenotipo de diversos tipos celulares que promueven la supervivencia y/o regeneración del tejido cardíaco (Orlic y cols., 2001; Quaini y cols., 2002). Un efecto más pronunciado se ha observado en un modelo de tirosinemia en ratones, en los cuales la fusión de las BMDSC con células enfermas conduce a la formación de hepatocitos funcionalmente habilitados para restaurar la función hepática (Lagasse y cols., 2000). En otras líneas de experimentación en animales, se han utilizado SC mesenquimales para tratar entidades patológicas que afectan al sistema nervioso central, la osteogénesis imperfecta, la osteoporosis y lesiones musculares. De igual modo se han aplicado SC mesenquimales en asociación con SC hematopoyéticas para preparar transplantes celulares autólogos y alogénicos (Noort y cols., 2002; Angelopoulou y cols., 2003). Las SC mesenquimales de la médula ósea han sido utilizadas incluso clínicamente para la reparación de patologías óseas y condropatías (Shi y cols., 2004).

Así que sería atractivo pensar a nivel conceptual que las células derivadas de la médula ósea pueden proporcionar células precursoras y/o células madre para estimular la cicatrización de heridas. Ya hay trabajos que confirman positivamente esta hipótesis. Recientemente, como ya hemos reflejado en esta memoria, se describió por primera vez que ciertos precursores de células endoteliales, pueden ser aislados de la sangre periférica del adulto, postulándose la idea de que estos precursores derivan de la médula ósea, contribuyendo a la neovascularización de la herida (Watt y Fox, 2005). Estos hallazgos pueden proporcionar tres estrategias potenciales para la utilización de precursores endoteliales en la cicatrización de heridas, y en general en la reparación tisular. En primer lugar pueden ser usados como biomarcadores para predecir el riesgo

de, o la respuesta a, la lesión tisular (Werner y cols., 2005). En segundo lugar, los precursores endoteliales movilizados dentro de la circulación por factores de crecimiento pueden proveer una rica fuente de progenitores vasculares para facilitar la neovascularización (Rumpold y cols., 2004; Murasawa y Ashahara, 2005; Ingram y cols., 2005; Urbich y Dimmeler; 2004; Werner y cols., 2005). Aunque los precursores endoteliales representan menos del 0.5% de todas las células circulatorias pueden ser expandidas “*ex vivo*” y posteriormente aplicadas “*in vivo*” para estimular la neovascularización en pacientes con patologías específicas (Rumpold y cols., 2004; Murasawa y Ashahara, 2005; Ingram y cols., 2005; Watt y Contreras, 2005; Urbich y Dimmeler; 2004). La tercera estrategia sería manipular estos precursores celulares “*in vivo*” para aumentar su eficacia en la reparación vascular.

Otros trabajos señalan que las SC de la médula ósea adulta pueden diferenciarse en células cutáneas, y sugieren un modelo que puede seguirse para alcanzar el mantenimiento de la homeostasis y la reparación cutánea. Los compartimentos tisulares contienen tres tipos celulares que contribuyen al mantenimiento de la integridad tisular, las células maduras, las ASC intraorgánicas, y en la circulación periférica las SC extraorgánicas. Del balance entre estos tres compartimentos celulares pueden surgir cambios en diferentes grados y con diferentes tipos de lesión lo que explicaría por qué en unos modelos las SC adquieren preferentemente un fenotipo dérmico y en otros uno epitelial. Las SC extraorgánicas juegan un menor papel en la cicatrización de las heridas en la ausencia de ciertos factores que las movilicen procedentes del área lesional, como el factor estimulante de las colonias de los granulocitos-macrófagos (G-CSF) y otros (Borue y cols., 2004).

En ausencia de lesión las BMDSC se integran en una pequeña proporción como células epiteliales en el hígado, pulmón, tracto gastrointestinal y piel. No está claro todavía si este fenómeno se debe a la transdiferenciación de células madre hematopoyéticas o si la médula contiene células pluripotenciales prehematopoyéticas que no han iniciado todavía un patrón de expresión genética determinado que induzca un destino hematopoyético o epitelial (Herzog y cols., 2003). Basándose en la localización y en las propiedades celulares, en algunas de las líneas de investigación citadas en las que las BMDSC adquieren el fenotipo queratinocítico, es probable que las BMDC se comporten como células aceleradoras de tránsito más que como SC cutáneas. El patrón de división celular y el comportamiento de las BMDC en el transcurso de la cicatrización sugiere un modelo modificado de reparación de heridas en

el cual las células de la médula ósea, en estos trabajos, se integran en la epidermis lesionada como queratinocitos (Borue y cols., 2004). Aunque una posibilidad alternativa sería que las células progenitoras penetren en el área de la herida y se fusionen con las células epidérmicas dañadas y por consiguiente con sus propiedades queratinocíticas, sin embargo, experiencias al respecto realizadas en estos mismos estudios utilizando el sistema “Cre-Lox”, fracasa en la detección de algún tipo de fusión con células epidérmicas (Harris y cols., 2004).

En definitiva según estos estudios podemos elaborar la hipótesis de que en el microambiente de la herida, las células precursoras que habitan en la médula ósea son reclutadas de forma no específica a través de la respuesta inflamatoria y pueden integrarse dentro de las heridas. En el área de la lesión los precursores celulares están expuestos a un microambiente que normalmente promueve la migración, proliferación, y diferenciación de SC epidérmicas (Savill y Sherratt, 2003; Frye y cols., 2003). Las BMDSC responden a estas señales mediante migración e integración en zonas de activa proliferación donde se diferencian en células aceleradoras de tránsito. Los factores requeridos para el reclutamiento y la diferenciación de estas células en la piel dañada, son todavía desconocidos (Borue y cols., 2004).

Reflexiones finales

Que la médula ósea parezca un candidato lógico para el tratamiento de heridas crónicas y/o que cicatrizen por segunda intención, debido a que contiene una rica variedad de estirpes celulares: células inflamatorias progenitoras, células madre mesenquimales y células madre multipotenciales... no evita que avancemos en el conocimiento de otros subtipos de SC que podrían estar más capacitadas para la solución terapéutica de determinadas heridas y de lesiones cutáneas en el contexto cuadros patológicos específicos.

Nuestro modelo contribuye a aportar soluciones en el debate surgido como consecuencia de la agria polémica generada, sobre el adecuado uso de las SC derivadas del blastocisto humano. La capacidad de utilizar con eficacia como hemos demostrado en este trabajo, ASC para aportar soluciones terapéuticas a determinadas patologías, podría resolver gran parte de los problemas ético-legales causados por el uso eventual de las ESC. Además, si las SC son autólogas, no habría una respuesta inmunológica adversa por parte de ningún tejido en el que se aplicaran y el hecho de tratar a los

pacientes con sus propias células limitarían la aparición de otros problemas jurídicos añadidos (Rasulov y cols., 2005). En esta línea está concebido nuestro estudio. Nos parecía vital teniendo en cuenta que no contamos todavía con perspectiva histórica suficiente acumular información sobre la forma de actuar de otras células madre como las MDSC no tan utilizadas, pues aunque las SC compartan propiedades biológicas entre ellas pudiera ser que presenten peculiaridades que las hagan más idóneas que las otras para ser más eficaces ante patologías específicas.

Nuestro modelo es válido para el estudio de múltiples parámetros histológicos, celulares y moleculares de la cicatrización. En la fase “*in vitro*” la caracterización y el enriquecimiento en los conocimientos sobre el crecimiento en cultivo de las MDSC, podría proveer una mejor comprensión de las funciones biológicas de los subtipos de precursores celulares que son requeridos para una estimulación óptima de la reparación de la herida. Aplicación. En nuestra línea de investigación en la que abordamos una valoración de la eventual eficacia de las MDSC en la cicatrización de heridas de espesor completo por segunda intención, a la luz de los resultados obtenidos podemos responder afirmativamente a la cuestión que nos planteábamos en la hipótesis. La aplicación de MDSC sobre heridas excisionales mejora su cicatrización promoviendo la reparación mediante el estímulo de la migración y la división celular (no sólo de estirpes celulares epiteliales sino también mesenquimales, como los fibroblastos), de la neoangiogénesis y del depósito ordenado de proteínas de la matriz; así como por el incremento de la síntesis de proteínas, tales como la fibronectina, (que favorecen la cohesión y la migración celular), el TGF- β , (que estimula la síntesis y liberación de proteínas de la matriz, la formación de una adecuada membrana basal, la diferenciación epidérmica¹ y la expresión de algunas de las subunidades de integrinas que facilitan la migración de los queratinocitos), y la integrina $\beta 1$ (que ejerce importantes funciones de enlace intercelular y de célula-matriz, así como en el control de la función y crecimiento queratinocíticos). La aplicación de las MDSC acelera la cicatrización estimulando el proceso de reepitelización incluso en ausencia del efecto beneficioso para la misma que hubiera proporcionado una eventual mejora de los fenómenos de contracción de la herida, los cuales no sólo no están estimulados sino que se encuentran inhibidos respecto a los grupos controles.

En definitiva si partimos de la premisa de que las SC pueden ser muy útiles en el tratamiento de las heridas, nunca se deben obviar todas aquellas opciones terapéuticas quirúrgicas ó no, que puedan favorecer la reparación (adecuado desbridamiento de la

herida con la exéresis de los restos necróticos y esfacelos, oportuna protección de la misma ante el riesgo de infección, vigilancia postural y movilización frecuente del paciente, etc.). Porque la eficacia potencial de los SC será tanto mayor en la medida en que facilitemos y mejoremos las dinámicas de la reparación fisiológica en el tratamiento de la herida.

Debido a que nuestras células están siendo liberadas a la dermis la preparación del lecho de la herida es crítica para permitir una adecuada integración de las SC derivadas de médula ósea al área de la lesión. Un adecuado desbridamiento de la herida, debe ser realizado antes de la aplicación celular. Recientemente ha aumentado el reconocimiento de aquellas ideas que preconizan que la óptima preparación del lecho de la herida debe acompañarse no sólo de un buen desbridamiento y de un adecuado control en evitar la contaminación bacteriana, sino también en una correcta reconstitución de la matriz de la herida y en el reacondicionamiento de las células fenotípicamente alteradas que residen en la misma. Para conseguir plenamente este objetivo los apósitos y otras terapias oclusivas, los factores de crecimiento aplicados localmente, y los injertos de piel con fibroblastos y/o queratinocitos no parecen ser suficientes. Las SC, en cambio, almacenan una “carga” biológica con un potencial dotado de cualidades biológicas excepcionales, para contrarrestar los efectos adversos provocados por el agente lesional. No en vano la naturaleza ha dispuesto que cuando se produce la agresión a un tejido uno de los mecanismos más eficaces y solventes provenga de la eficaz contribución de las SC. Con la aplicación de las SC en modelos de cicatrización de heridas, en realidad no hacemos sino intentar gestionar con mayor eficacia un recurso con el que ya cuenta nuestro organismo.

A la luz de nuestros resultados podemos convenir que nuestros hallazgos generan expectativas para consolidar la idea de que las células precursoras que habitan en los compartimentos musculares puedan integrarse dentro de las heridas y contribuir no ya sólo a la cicatrización sino a la aspiración de una perfecta regeneración cutánea como ocurre en los embriones.

Pero para nuestro grupo lo importante no es sólo esta afirmación sino encontrar una adecuada respuesta a las siguientes preguntas: ¿estamos aplicando las SC de una forma correcta? ¿es la forma ideal de aplicar SC? ¿Es un determinado subtipo de SC el adecuado para esta patología específica? Y si no fuera así ¿existen alternativas mejores?

De igual forma sería muy interesante descifrar las claves que induzcan a las SC incorporadas al tejido a adquirir un fenotipo determinado dentro de las posibilidades

que le ofrecen las distintas estirpes celulares del entorno celular de la lesión. Nuestro trabajo y otros similares al nuestro, podrán contribuir a dilucidar en parte estas cuestiones.

Parte de las dificultades que tenemos en descifrar los mecanismos de reparación tisular son una consecuencia de la redundancia y entrecruzamientos en el sistema. La mayoría de las señales que aparecen en la lesión probablemente controlan más de una actividad celular, y la mayoría de las actividades celulares aparecen en respuesta a un cóctel de señales. Hemos definido la reparación como un proceso complejo. En el momento actual ya se conocen varios cientos de mediadores moleculares de la reparación. Una misma molécula con actividad biológica puede activar distintos receptores específicos, incluso puede existir la reactividad cruzada entre principios activos dadas las similitudes estructurales entre los receptores y de hecho, un factor de crecimiento puede activar receptores específicos de otros factores.

Asimismo una interrelación compleja de lazos de “feed-back” surge en el medioambiente tisular, donde los FC se regulan asimismo, y los unos a los otros durante el crecimiento tisular (Herndon y cols., 1993). Además los interruptores moleculares intracitoplasmáticos activados pueden disparar múltiples rutas de señalización enzimática y por si fuera poco para complicar un poco más todo este proceso, la acción del principio activo puede repercutir sobre extensas secuencias de genes a nivel intranuclear. Por otra parte los diferentes subtipos de SC que encontramos en el organismo pertenecientes ó no al tejido lesionado presentan características distintas con una carga biológica de factores de crecimiento y citocinas específicas, y además poco sabemos de los mediadores moleculares que facilitan la integración, migración, interacción y diferenciación celular de las SC una vez se incorporan al tejido. No debemos olvidar de igual forma que el descubrimiento relativamente reciente de las propiedades y funciones biológicas de las SC hace que todavía ignoremos otros efectos nocivos que su utilización pueda acarrear.

La complejidad del proceso es evidente, pero nos debe servir en todo caso para acercarnos a él si cabe, aún con mayor criterio y rigor científico. Con estas premisas es lógico aventurar que en la medida que conozcamos mejor las propiedades y funciones biológicas de las células stem podremos rentabilizar mejor sus acciones terapéuticas y evitar al mismo tiempo una eventual ineficacia de las mismas así como los efectos nocivos derivados de una utilización inadecuada. Además la implicación de la reparación tisular en numerosas patologías permite que de cualquier aportación

novedosa ó estrategia terapéutica eficaz podamos obtener un beneficio exponencial para múltiples cuadros patológicos. Nuevos horizontes se abren en el futuro para avanzar en el tratamiento de la cicatrización de las heridas ya que nuestros conocimientos sobre biología celular y molecular acerca de los mecanismos de la reparación, han progresado considerablemente en los últimos años.

En efecto, el futuro prometedor de la investigación biomédica no se podría entender sin los avances en el conocimiento de las células stem, los nuevos moduladores moleculares, la terapia génica, y los nuevos sistemas de liberación de principios activos y la evidencia de su versatilidad funcional involucra a todas las disciplinas médicas. Con respecto a las SC no hemos hecho sino empezar a conocer el comportamiento de las mismas en la reparación de los tejidos, quedando todavía numerosas incógnitas por desentrañar, pero en los próximos años probablemente, los avances obtenidos a través de múltiples líneas de investigación contribuirán a desenredar la “madeja” del complejo proceso de la reparación cutánea.

Pero es evidente que precisamos de más estudios innovadores que nos proporcionen nuevas aportaciones y estrategias terapéuticas en los que consigamos acelerar la cicatrización de las heridas obteniendo una recuperación rápida y con un resultado final funcionalmente perfecto.

¿Qué cuestiones permanecerán previsiblemente en el futuro, y qué más necesitamos saber para avanzar en el tratamiento clínico de los problemas que plantean la reparación de los tejidos?

Solamente las excoriaciones superficiales de la piel cicatrizan según el patrón de regeneración fisiológica, en virtud del cual, la resultante queda completa y uniforme. Todas las demás heridas reemplazan la pérdida de tejido resultante, como ya se especificó, mediante la migración celular desde el borde de la herida y el mantenimiento de las formaciones anexas que no han sido dañadas. El resultado de esta reepitelización no representa un reemplazo de la piel en toda regla, sino que es un tejido sustitutivo delgado y avascular, al que le faltan componentes esenciales de la epidermis como son las glándulas y los pigmentóforos, e importantes atributos de la piel, como por ejemplo una aceptable inervación. En los próximos años en la investigación sobre la reparación de las lesiones, será excitante comprobar si podemos mejorar la naturaleza e inducir lesiones de adultos que reparen como las lesiones embrionarias, es decir, de forma rápida, sin fibrosis, con una completa regeneración “*ad integrum*” del tejido y con un resultado final funcionalmente perfecto.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nuestros objetivos, nos permiten formular las siguientes conclusiones:

1. La población MDSC, aislada a partir de músculo esquelético, comparada con la población de fibroblastos utilizados como control de células diferenciadas, posee las propiedades inherentes a una población de células indiferenciadas (no existencia de marcadores de diferenciación, positividad para marcadores de células indiferenciadas como CD34, M-Cadherina) con una proliferación unas cinco veces superior al grupo de fibroblastos, y capacidad de autorrenovación (más de 60 subcultivos).
2. Tras 14 días de cultivo, la población de MDSC sigue siendo indiferenciada, proliferativa y muy adherente (Vimentin +), por lo que consideramos que son características idóneas para ser transplantadas como terapia celular sobre un defecto cutáneo excisional.
3. Los defectos sometidos a terapia celular durante dos semanas, mostraron una significativa ($p < 0.05$) disminución del área de contracción del defecto creado, así como una significativa ($p < 0.05$) aceleración de la reepitelización con respecto al grupo sin tratamiento alguno.

Las conclusiones anteriores, nos permiten elevar nuestras hipótesis a categoría de tesis y afirmar que:

- ❖ Las células derivadas de células musculares indiferenciadas MDSC aisladas por nosotros y tras 14 días de cultivo, cumplen los requisitos exigidos para su uso como terapia celular, tanto en número como características de adhesión, proliferación y diferenciación.
- ❖ Su utilización como terapia celular en un modelo experimental nos permite mejorar significativamente la reparación del defecto excisional creado.

Bibliografia

Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Niyibizi C, Huard J. Muscle derived cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol* 2002; 29 (9):1920-1930.

Ahn ST, Mustoe TA. Effects of ischemia on ulcer wound healing: a new model in the rabbit ear. *Ann Plast Surg* 1990; 24 (1):17-23.

Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 419-423.

Amit M, Carpenter M, Inokuma K, Chiu MS, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227:271-278.

Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer and serum free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004; 70: 837-845.

Andrews RE, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of Cd33 and CD34 antigen and light scatter. *J Exp Med* 1989; 169:1721-1731.

Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE, Rinder HM, Civin C, Cheng L, Krause DS. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD\SCID mice. *Exp Hematol* 2003; 31: 413-420.

Aoyama H, Asamoto K. Determination of somite cells: independence of cell differentiation in morphogenesis. *Development* 1988; 104: 15-28.

Asakura A, Komaki M, Rudnicki MA. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001; 68:245-253.

Asakura A, Rudnicki MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 2002; 30(11):1339-1345.

Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki M. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; 159 (1): 123-134.

Asakura A. Stem cells in adult skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13:123-128.

Atala A. Tissue engineering and Regenerative medicine: Concepts for Clinical Application. *Rejuvenation Res* 2004; 7 (1): 15-31.

Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol* 2003; 139: 510-516.

Balza E, Borsi L, Allemanni G, Zardi L. Transforming growth factor β regulates the levels of different fibronectin isoforms in normal cultured fibroblasts. *FEBS Lett* 1988; 228: 42-44.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:568-584.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000; 151:1221-1234.

Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993a; 165 (6): 728-737.

Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993b; 166(1). 74-81.

Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts and myofibroblasts. *Plastic Recons Surg* 1998; 102: 124-31.

Bianchi de Di Risio CC, Callero F, Hidalgo A, Argibay P. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64:543-549.

Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* 2003; 287:98-105.

Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G, Cancedda R, Quarto R. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound Rep Reg* 2001; 9: 460-466.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19:180-192.

Bischoff R. Enzymatic liberation of myogenic cells from adult rat muscle. *Anat Rec* 1974; 180: 645-662.

Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. *Myology Volume I. Secondth edition*. Edited by: Engel AG and Franzini-Armstrong C. New York, McGraw-Hill, Inc.; 1994:97-118.

Bishop AE, Buttery LDK, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 424-429.

Bissell MJ, Kenny PA, Radisky DC. Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 1-74.

Bjerknes M, Chen H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:767-777.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995; 376:768-771.

Blau H, Grace K, Pavlath EC, Hardeman CPC, Silberstein L, Webster SG, Miller SC, Webster C. Plasticity of the differentiated state. *Science* 1985; 230: 758-766.

Blau H, Webster C. Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:5623-5627.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-352.

Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 519-526.

Border WA, Nobel NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.

Bornemann A, Schmalbruch H. Immunocytochemistry of M-cadherin in mature and regenerating rat muscle. *Anat. Rec* 1994; 239:119-125.

Borue X, Lee S, Grove J, Herzog EL, Harris R, Diflo T, Glusac E, Hyman K, Theise ND, Krause DS. Bone marrow- derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol* 2004; 165: 1767-1772.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittet JF, Nishimura SL, Aldape K, Landers DV, Carpenter W. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 1995; 108: 2241-2251

Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop* 1992; 275: 287-299.

Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 492-509.

Brock J, Mc Cluskey J, Baribault H, Martin P. Perfect wound healing in the keratin 8 deficient mouse embryo. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1996; 35 (4):358-366.

Brown LF, Dubin D, Lavigne L, Logan B, Dvorak HF, Van de Water L. Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *Am J Pathol* 1993; 142 (3):793-801.

Buján J, Pascual G, Corrales C, García-Honduvilla N, Bellón JM. Muscle-derived stem cells used to treat skin defects prevent wound contraction and expedite reepithelialization. *Wound Rep Regen* 2006; 14: 217-224.

Buonanno A, Apone L, Morasso MI, Beers R, Brenner HR, Eftimie R. The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:539-544.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4:487-525.

Cairols MA. La ulceración venosa y arterial de los miembros inferiores. Edika Med. Barcelona 2002.

Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; 7: 259-264.

Cardasis CA, Cooper GW. An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: a satellite cell-muscle fiber growth unit. *J Exp Zool* 1975; 191:347-358.

Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* 1997; 327: 1-16.

Carrascal E. *Histología Humana I*. Salamanca: Librería Cervantes, 2001. Pág 269.

Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 2004; 103: 2504-2512.

Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238.

Christ B, Ordahl CP. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol* 1995; 191: 381-396.

Christiano AM, Lebowitz MG, Boyd CD, Uitto J. Workshop on pseudoxanthoma elasticum: molecular biology and pathology of the elastic fibers. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 660-663.

Clark RA, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresh DA. Transient functional expression of alphaVbeta 3 on vascular cells during wound repair. *Am J Pathol* 1996; 148: 1407-21.

Clark RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum, 1996.

Cochard, L.R. *Atlas de Embriología Humana*. Ed. Masson, 2005.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3213-3218.

Compton CC, Gill JM, Bradford DA, Regauer S, Gallico GG, O'Connor NE. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab Invest* 1989; 60(5):600-612.

Conlon RA, Reaume AG, Rossant J. Notch is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 1995; 121: 1533-1542.

Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 2005; 124: 201-208.

Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 1997; 270-283.

Cornelison DDW, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol* 2001; 239:79-94.

Cotran R, Kumar V, Collins T. Reparación de los tejidos, proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: *Patología estructural y funcional: Mc Graw Hill Interamericana*, 2000 pp 95-120.

Crijns MB, Klaver C, de Boer A, Van Hees C, Vermeer BJ, Vandembroucke J, Bergman W. Ultraviolet exposure and the development of banal and atypical naevi-a cross-sectional study on Curacao and in The Netherlands. *Melanoma Res* 1997; 7: 407-416.

Cruz PD. The epidermis: an outpost of the immune system. En: *Frienkel RK, Woodley DT. The biology of the skin. New york: Parthenon publishing*, 2001. Pp255-263.

Cumberbatch M, Kimber I. Dermal tumor necrosis factor- α induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langergans' cell migration. *Immunology* 1992; 75: 257-263.

Dale K, Pourquieo A. A clock-work somite. *Bio Essays* 2000; 22: 72-83.

De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999; 147: 869-878.

Deasy BM, Huard J. Gene therapy and tissue engineering based on muscle-derived stem cells. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4 (4):382-389.

DeGroot LJ, Jameson JL. *Endocrinology*. WB Saunders Company, Philadelphia, 2001.

Desgranges P, Barbaud C, Caruelle JP, Barritault D, Gautron J. A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle. *FASEB J* 1999; 13:761-766.

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. TGF- β induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblast. *J Cell Biol* 1993; 122: 103-11.

Díaz-Flores L, Gutierrez R, López-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblast in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop* 1992; 275: 280-286.

Dickson G, Peck D, Moore SE, Barton CH, Walsh FS. Enhanced myogenesis in NCAM Transfected mouse myoblasts. *Nature* 1990; 344:348-351.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stem cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential of propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107:275-281.

Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1998; 13(5):828-838.

Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-97.

Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1349-1353.

El-Ghalbzouri A, Van Den Bogaerdt AJ, Kempenaar J, Ponc M. Human adipose tissue-derived cells delay re-epithelialization in comparison with skin fibroblast in organotypic skin culture. *Br J Dermatol* 2004; 150: 444-454.

Ewton DZ, Spizz G, Olson EN, Florini JR. Decrease in transforming growth factor- β binding and action during differentiation in muscle cells. *J Biol Chem* 1988; 263 (8): 4029-4032.

Falke GF, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr* 2000; 98(2):103-114.

Fennie C, Cheng J, Dowbenko D, Young P, Lasky LA. Cd34+ endothelial cell lines derived from murine yolk sac induce the proliferation and differentiation of yolk sac CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 1995; 86:4454-4467.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.

Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy and ethics. *J Clin Invest* 2004; 114: 1364-1370.

Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 1994; 162: 499-510.

Flanagan-Steet H, Hannon K, McAvoy MJ, Hullinger R, Olwin BB. Loss of FGF receptor 1 signaling reduces skeletal muscle mass and disrupts myofiber organization in the developing limb. *Dev Biol* 2000; 218: 21-37.

Florini JR, Roberts AB, Ewton DZ, Falen SL, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor- β a very potent inhibitor of myoblast differentiation, identical to the

differentiation inhibitor secreted by buffalo rat liver cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 16509-16513.

Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation : what is its molecular basis. *Cell* 1996; 87:1153-1155.

Forbes S, Vig P, Poulson R, Thomas H, Alison M. Hepatic stem cells. *J Pathol* 2002 b; 197: 510-518.

Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)* 2002 a; 103: 355-369.

Fox D, Kouris GJ, Blumofe KA, Heilizer TJ, Husak V, Greisler HP. Optimizing fluorescent labeling of endothelial cells for tracking during long -term studies of autologous transplantation. *J Surg Res* 1999; 86 (1): 9-16.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplant of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381-390.

Frye M, Gardner C, Li ER, Arnold I, Watt FM. Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 2003; 130: 2793-2808.

Fu W, Begley JG, Killen MW, Mattson MP. Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1999; 274:7264-7271.

Fu W, Killen M, Pandita T, Mattson MP. The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function. *J Mol Neurosci* 2000; 14: 3-15.

Fuchs E. Beauty is skin deep: the fascinating biology of the epidermis and its appendages. *Harvey Lectures Series* 2001; 94: 47-77.

Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhasonay C, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific α -type actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 298-302.

Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblasts concept. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 545-548.

Gaillet J, Welch MP, Clarck RAF. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during reepithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 1994; 103(2):221-227.

Gallego R, García-Caballero M, Fraga A, Beiras A, Forteza J. Neural cell adhesion molecule in immunoreactivity in Merkel cells and Merkel cell tumors. *Virchows Arch* 1995; 426: 317-321.

Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000; 3: 986-991.

Gallico G, O'Connor EN, Compton CC, Kehrade O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-451.

García Miralles T, Gosalbez-García J. Marcadores inmunohistoquímicos del desarrollo embriológico en el músculo estriado de las extremidades fetales. <http://conganat.uninet.edu/conferencias/C006>, 2002.

Garlick JA, Taichman LB. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest* 1994; 70(6): 916-24.

Gerecht-Nir S, Itskovitz-Eldor J. The promise of human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004 a; 18 (6):843-852.

Gerecht-Nir S, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells: A potential source for cellular therapy; *Am J of transplantation* 2004b; 4 (Suppl 6): 51-57.

Gerecht-Nir S, Ziskind A, Cohan S, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells as in vitro model for human vascular development and the induction of vascular differentiation. *Lab Invest* 2003; 83; 1811- 1820.

Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shadduck RK. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD (34+) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2000; 28: 1297-1305.

Goetinck PF, Winterbottom N. Proteoglycans: molecular macromolecules of the extracellular matrix. In: Goldsmith LA (ed) *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991. Pp 558-575.

Goetzl EJ. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996; 156: 1-8.

Grant M, Jerdan J, Merimee TJ. IGF-1 modulates endothelial cell chemotaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 370-1.

Grant MB, Khau PT, Schultz GS, Adams JL, Shimizu RW. Effects of EGF, FGF, and TGF- β on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 3292-301.

Green H, Easley K, Luchi S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15625-15630.

Grinell F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci* 1992; 101 (1): 1-5.

Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. Identification of muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tiss Res* 1992; 267: 99-104.

Guo L, Degenstein L, Dowling J, Yu QC, Wollmann R, Perman B, Fuchs E. Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* 1995; 81 (2): 233-243.

- Guo M, Jan LY, Jan YN. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* 1996; 17: 27-41.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland C, Buzney E, Khan M, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394.
- Haake A, Scott GA, Holbrook KA. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. En: Freinkel RK, Woodley DT. *The biology of the skin*. New York: Parthenon Publishing, 2001. Pp 113-131.
- Haapasalmi K, Zhang K, Tonnesen M, Olerud J, Sheppard D, Salo T, Kramer R, Clark RA, Uitto VJ, Larjava H. Keratinocytes in human wounds express alpha v beta 6 integrin. *J Invest Dermatol* 1996; 106(1): 42-48.
- Harding KG, Morris G, Patel GK. Healing chronic wounds. *BMJ* 2002; 324: 160-163.
- Harlan DM, Kirk AD. The future of organ and tissue transplantation: can T-cell co-stimulatory pathway modifiers revolutionize the prevention of graft rejection? *J Am Med Assoc* 1999; 282: 1076-1082.
- Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutant Res* 1991; 256: 271-282.
- Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, Grove JE, Van Arnem JS, Krause DS. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004; 305: 90-93.
- Hartmann. Las heridas y su tratamiento. www.úlceras.net/la_piel.htm 1999.
- Hattan N, Kawaguchi H, Ando K, Kuwabara E, Fujita J, Murata M, Suematsu M, Mori H, Fukuda K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 334-344.
- Hauser C, Elbe A, Stingl E. The Langerhans' cell. En: Goldsmith LA (ed.) *physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991. Pp144-163.
- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001; 91:534-551.
- He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types cardiac myocytes. Action potential characterization. *Circ Res* 2003; 93:32-39.
- Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2):754-753.
- Herndon DN, Nguyen TT, Gilpin DA. Growth factors. Local and systemic. *Arch Surg* 1993; 128:1227-1233.

Herreros J, Prósper F, Perez A, Gavira JJ, García-Velloso MJ, Barba J, Sánchez PL, Cañizo C, Rábago G, Martí-Climent JM, Hernández M, López-Holgado N, González-Santos JM, Martín-Luengo C, Alegria E. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003; 24: 2012-2020.

Hertle MD, Kubler MD, Leigh IM, Watt FM. Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis. *J Clin Invest* 1992; 89 (6): 1892-1901.

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-3493.

Hewitt HB. Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA mice. *Br J Cancer* 1958; 12: 378-401.

Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14: 538-546.

Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 468-478.

Ikari N, Yoshino H, Moses AC, Flier JS. Evidence that receptor aggregation may play a role in transmembrane signaling through the insulin-like growth factor-I receptor. *Mol Endocrinol* 1998; 2: 831-837.

Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; 106: 1525-1531.

Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated and regenerating mouse muscles. *Dev Dynam* 1994; 199:326-337.

Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 479-491.

Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (suppl 1): 11854-11860.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Kee CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002c; 418: 41-49.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Troy L, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002a; 418 (6893): 41-49.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol* 2002b; 30:896-904.

Jiménez PA, Jiménez SE. Tissue and cellular approaches to wound repair. *Am J Surg* 2004; 187: 56S-64S.

Jones J, Sugiyama M, Watt FM, Speight PM. Integrin expression in normal, hyperplastic, dysplastic, and malignant oral epithelium. *J Pathol* 1993; 169: 235-243.

Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 1995 a; 80: 83-93.

Jones PH. The isolation and characterisation of human epidermal stem cells. University College London : London, 1995 b.

Junqueira L, Bignolas G, Brentani R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11: 447-455.

Kablar B, Rudnicki MA. Skeletal muscle development in the mouse embryo. *Histol Histopathol* 2000; 15:649-656.

Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *J Biochem* 1996; 316: 1-11.

Kauffmann U, Martin B, Link D, Witt K, Zeitler R, Reinhard S, Starzinski-Powitz A. M-cadherin and its sisters in development of striated muscle. *Cell Tissue Res* 1999; 296: 191-198.

Kennea NL, Mehmet H. Neural stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 536-550.

Kidd RL, Krawczyk WS, Wilgram GF. The Merkel cell in human epidermis: its differentiation from other dendritic cells. *Arch Dermatol Forsch* 1971; 241(4): 374-84.

Kierszenbaum AL. *Histology and cell biology: an introduction to pathology*, 2002. Pág 307.

Knudsen K. Cell adhesion molecules in myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2:902-906.

Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 2000; 289: 1754-1757.

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996; 87: 1-13.

Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 1994; 84: 691-701.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegarin O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis ST. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377.

LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111: 589-601.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.

Lam PK, Chan ES, Liew CT, Lau C, Yen SC, King WW. Combination of a new composite biocompatible skin graft on the neodermis of artificial skin in an animal model. *ANZ J Surg* 2002; 72: 360-363.

Lampkin BD. Cell Kinetics as related to treatment of patients with acute nonlymphoid leukaemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1985; 7: 358-372.

Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers and location. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13473-13475.

Lee JY, Qu-Peterson Z, Cao B, Kimura S, Jankowski R, Cummins J, Usas A, Gates C, Robins P, Wernig A, Huard J. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 2000; 150:1085-1099.

Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol.* 1975; 78(1): 71-100.

LetterioJJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB. Maternal rescue of transforming growth factor- β 1 null mice. *Science* 1994; 264: faltan pages

Levy L, Broad S, Diekmann D, Evans RD, Watt FM. Beta 1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell* 2000; 11:453-466.

Liebersbach BF, Sanderson RD. Expression of syndecan 1 inhibits cell invasion into type I collagen. *J Biol Chem* 1994; 269 (31):20013-20019.

Llames S, Garcia E, Garcia V, Del Rio M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holgin P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank* 2006; 7: 47-53.

Llames SG. Desarrollo de una dermis artificial basada en plasma humano. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo 2004.

Maina R, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R, Ponzetto C. Uncoupling of Grb2 from the met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 1996; 531-542.

Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest* 2003; 111: 71-79.

- Maltin CA, Harris JB, Cullen MJ. Regeneration of mammalian skeletal muscle following the injection of the snake-venom toxin, taipoxin. *Cell Tissue Res* 1983; 232:565-577.
- Martin GR. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* 1980; 209:768-76.
- Martin P. Wound healing. The aim for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276:75-81.
- Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 853-891.
- Massague J. The TGF- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
- Matsuri Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70: 841-847.
- Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9:493-495.
- McKee PH, Calonje E, Granter SR. Pathology of the skin. En: The structure and function of skin: Elsevier mosby, third edition, vol I, 2005. Pp 1-36.
- McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *PNAS* 2002; 99 (3): 1341-1346.
- Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal S, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast containing fibrin gels. *Burns* 1998; 24: 621-630.
- Megeney L, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the myoD-family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 1995; 73: 723-732.
- Melo F, Carey DJ, Brandan E. Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenic expression. *J Cell Biochem* 1996; 62: 227-239.
- Menard C, Hagege AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Puceat M, Menasche P. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 2005; 366(9490):1005-1012.
- Menasché P. Skeletal muscle satellite cell transplantation. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 351-357.
- Mendez MV, Stanley A, Phillips T, Murphy M, Menzoian JO, Park HY. Fibroblasts cultured from distal lower extremities in patients with venous reflux display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* 1998; 28: 1040-1050.
- Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Sirabella D, Baiocchi M, De Maria R, Boratto R, Jaffredo T, Broccoli V, Bianco P, Cossu G. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that

originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 2002; 129: 2773-2783.

Mirabet LV, Lequerica JL, Montero JA, Hurtado C, Carbonell F. Cultivo in vitro de células satélite de músculo esquelético. ¿Una alternativa terapéutica para el tratamiento de la cardiopatía isquémica? *Investigación cardiovascular* 2000; 3: 91-103.

Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 1996; 84 (3): 371-379.

Molkentin JD, Olson EN. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 445-453.

Mommaas AM, Teepe RG, Leigh MI, Mulder AA, Koebrugge EJ, Vermeer BJ. Ontogenesis of the basement membrane zone after grafting cultured human epithelium: a morphologic and immunoelectron microscopic study. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 71-77.

Moore R, Walsh FS. The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle. *Development* 1993; 117: 1409-1420.

Morel F, Szilvassy SJ, Travis M, Chen B, Galy A. Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen. *Blood* 1996; 88:3774-3784.

Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2003; 35: 1151-1156.

Morris RJ, Coulter K, Tryson K, Steinberg SR. Evidence that cutaneous carcinogen-initiated epithelial cells from mice are quiescent rather than actively cycling. *Cancer Res* 1997; 15: 3436-3643.

Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec* 1971; 170: 421-435.

Munger BL. The Biology of merkel cells. En: Goldsmith LA (ed) *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991. Pp 836-856.

Munster AM, Weiner SH, Spence RJ. Cultured epidermis for coverage of massive burn wounds. A single center experience. *Ann Surg* 1990; 211: 676-680.

Murasawa S, Ashahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 36-42.

Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:704-713.

Nanney LB. Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. *J Invest Dermatol* 1990; 624-9.

Narisawa Y, Hashimoto K, Nihei Y, Pietruk T. Biological significance of dermal Merkel cells in the development of cutaneous nerves in human fetal skin. *J Histochem Cyto chem* 1992; 40: 65-71.

Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen CD34 is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol* 1990; 127: 523-529.

Niyonsaba F, Ogawa H. Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *J Dermatol Sci* 2005; 40 (3): 157-168.

Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MHM, Löwik CWGM, Falkenburg JHF, EW Fibbe. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002; 30: 870-878.

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19:193-204.

Olguin H, Brandan E. Expression and localization of proteoglycans during limb myogenic activation. *Dev Dyn* 2001; 221: 106-115.

Omori N, Omori M, Evarts RP, Teramoto T, Miller MJ, Hoang TN Thorgeirsson SS. Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem -dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology* 1997;26:720-727.

Ordahl CP, Williams BA. Knowing chops from chuck: roasting MyoD redundancy. *BioEssays* 1998; 20: 357-362.

Ordahl C, LeDouarin NM. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 1992; 114:339-353.

Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci* 1998, 94:549-555.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.

Osses N, Brandan E. ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 282: C383-394.

Otto WR, Nanchahal J, Lu QL, Boddy N, Dover R. Survival of allogenic cells in cultured organotypic skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 1995; 96: 166-176.

Otto WR. Lung epithelial stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 527-535.

Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge

keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 1996; 132 (3): 381-397.

Pan Y, Chen X, Wang S, Yang S, Bai X, Chi X, Li K, Liu B, Li L. In vitro neuronal differentiation of cultured human embryonic germ cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 2005; 327: 548-556.

Papioannou VE. Ontogeny, pathology, oncology. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 33-37.

Partridge TA. Cells that participate in regeneration of skeletal muscle. *Gene Ther* 2002; 9(11):752-753.

Pascual G, Escudero C, Rodriguez M, Corrales C, Serrano N, Bellón JM, Buján J. Restoring the endothelium of cryopreserved arterial grafts: co-culture of venous and arterial endothelial cells. *Cryobiology* 2004a; 49: 272-285.

Pascual G, Martinez S, García-Honduvilla N, Corrales C, Bellón JM, Buján J. Long-term behaviour of cryopreserved arterial grafts versus prosthetic micrografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004b; 27: 423-431.

Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol* 2004; 12:311-319.

Peterson CA. Cell culture systems as tools for studying age-related changes in skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50 Spec No: 142-144.

Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferratio J, Fagioli F, Berger M, Aglietta M. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997; 89: 2644-2653.

Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. PDGF (BB homodimer), TGF- β , and bFGF in dermal wound healing. *Am J Pathol* 1992; 140: 1375-1388.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *Science* 1999; 284:143-147.

Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci (suppl)* 1988; 10:45-62.

Potten CS. Cell replacement in epidermis (keratoposis) via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytol* 1981; 271: 271-318.

Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002; 197: 441-456.

Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; 18: 747-783.

Presnell SC, Petersen B, Heidarani M. Stem cells in adult tissues. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 369-376.

Price AA, Cumberbatch M, Kimber I, Ager A. α_6 integrins are required for Langerhans' cell migration from the epidermos. *J Exp Med* 1997; 186: 1725-1735.

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrani CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N England J Med* 2002; 346: 5-15.

Qu-Petersen Z, Deasy B, Jandowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice : potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; 157:851-864.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev. Biol* 2003; 19: 1-22.

Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003; 12: 1-11.

Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 2001; 122 (7):713-734.

Rasulov MF, Vasil'chenkov AV, Onishchenko NA, Krashennnikov ME, Kravchenko VI, Gorshenin TL, Pidtsan RE, Potapov IV. First Experience in the use of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139 (1): 141-144.

Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop* 1998; 346:95-103.

Renault V, Rolland E, Thornell LE, Mouly V, Butler-Browne G. Distribution of satellite cells in the human vastus lateralis muscle during aging. *Exp Gerontol* 2002; 37:1513-1514.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414:105-111.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-2625.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4

Roberts N, Jahangiri M, Xu Q. Progenitor cells in vascular disease. *J Cell Mol Med* 2005; 9 (3):583-591.

Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 1994; 76 (6):1063-1073.

Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005; 87:125-128.

Rosen GD, Sanes JR; LaChance R, Cunningham JM, Roman J, Dean DC. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM- 1 in myogenesis. *Cell* 1992; 69:1107-1119.

Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Partridge TA. Culturing satellite cells from single muscle fiber explants. *In vitro Cell Dev Biol* 1995; 31:773-779.

Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2004. Pág 404.

Rubin H. Cell aging in vivo and in vitro. *Mech Ageing Dev* 1997; 98:1-35.

Rubin H. The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 675-681.

Rudland PS. Stem cells and the development of mammary cancers in experimental rats and in humans. *Cancer Metastasis Rev* 1987; 6: 55-83.

Rudnicki MA, Jaenish R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *BioEssays* 1995; 17:203-209.

Rue LW, Cioffi WG, Mc Manus W, Pruitt BA. Wound closure and outcome in extensively burned patients treated with cultures autologous keratinocytes. *J Trauma* 1993; 34: 662-668.

Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med* 2004; 8: 509-518.

Sadiq TS, Gerber DA. Stem cells in modern medicine: Reality or myth? *J Surg Res* 2004; 122: 280-291.

Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, Barresi R, Bresolin N, De Angelis MG, Campbell KP, Bottinelli R, Cossu G. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 2003; 301: 487-492.

Saulis A, Mustoe TA. Models of wound healing in growth factor studies. *Surgical Research* 2001; 62: 857-873.

Savill NJ, Sherratt JA. Control of epidermal stem cells clusters by Notch-mediated lateral induction. *Dev Biol* 2003; 258: 141-153.

Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benevenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:11307-11312.

Schulz TC, Palmarini GM, Noggle SA, Weiler DA, Mitalipova MM, Condie BG. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neuroscience* 2003; 4: 27.

Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem- cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000; 218: 115-124.

- Segev H, Fishman B, Ziskind A, Schulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem cells* 2004; 22:265-274.
- Sheridan RL, Tomkins RG. Cultured autologous epithelium in patient with burns of ninety per cent or more of the body surface. *J Trauma* 1995; 38 (1): 48-50.
- Shi C, Cheng T, Su Y, Mai Y, Qu J, Lou S, Ran X, Xu H, Luo C. Transplantation of dermal multipotent cells promotes survival and wound healing in rats with combined radiation and wound injury. *Radiat Res* 2004; 162: 56-63.
- Shi CM, Cheng TM. Dermal multipotent cells promote the hematopoietic recovery in sublethally irradiated rats. *Chin J Radiol Radioprot* 2003b; 6: 435-438.
- Shi CM, Cheng TM. Effects of wound environment on biological properties of dermal multipotent stem cells in rats. *Chin J Trauma* 2003a; 19: 199-203.
- Shi CM, Cheng TM. Isolation and culture of multipotent stem cells derived from neonatal rat dermis. *Acta Acad Med Mil Ter* 2001; 9: 1068-1071.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103: 2787-2796.
- Slavin J. The role of cytokines in wound healing. *J Pathol* 1996, 178: 5-10.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1998; 336: 688-690.
- Snow MH. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *Anat Rec* 1983; 207:593-604.
- Snow MH. Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. *Anat Rec* 1990; 227:437-446.
- Sottile V, Thomson A, Mc Whir J. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 149-155.
- Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, KlingeH, Schümichen C, Nienaber CA, Freud M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46.
- Stocum DL. Regenerative biology and engineering: strategies for tissue restoration. *Wound Rep Reg* 1998; 6: 276-290.
- Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Rep Reg* 2001; 9: 429-442.

Suen PM, Leung PS. Pancreatic stem cells: A Glimmer of Hope for Diabetes? *J Pancreas* 2005; 6 (5): 422-424.

Tachibana T. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 379-396.

Tajbakhsh S, Buckingham M. The Birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol* 2000; 48:225-268.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; 251: 1451-1455.

Takeichi M. The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 1988; 102: 639-655.

Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, Hotta T, Roy RR, Edgerton VR. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; 157 (4):571-577.

Taylor-Jones JM, McGehee RE, Rando TA, Lecka-Czernik B, Lipschitz DA, Peterson CA. Activation of an adipogenic program in adult myoblasts with age. *Mech Ageing Dev* 2002; 123:649-661.

Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow- derived cells. *Blood* 2005; 105: 1068-1077.

Thomas DW, Harding KG. Wound healing. *Br J Surg* 2002; 89: 1203-1205.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 778-784.

Toole BP, Gross J. The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol* 1971; 25: 57-77.

Torrente Y, Trimblay JP, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, Sironi M, Fortunato F, El Fahime M, D'Angelo MG, Caron NJ, Constantin G, Paulin D, Scarlato G, Bresolin N. Intraarterial injection of muscle -derived CD34+Sca-1+ stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol* 2001; 152:335-348.

Trott KR. Tumor stem cells: The biological concept and its application in cancer treatment. *Radiother Oncol* 1994; 30: 1-5.

Tsai RY, Kittappa R, Mc Kay RGD. Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell* 2002; 2: 707-712.

Tzukerman M, Rosenberg T, Ravel Y, faltan autores . An experimental platform for studying growth and invasiveness of tumor cells within teratomas derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13507-13512.

Udey MC. Cadherins and Langerhans' cell immunobiology. *Clin Exp Immunol* 1997; 107 (Suppl.): 6-8.

Uitto J, Christiano AM, Kahari VM, Bashir MM, Rosenbloom J. Molecular biology and pathology of human elastin. *Trans Biochem Soc* 1991b; 19: 824-829.

Uitto J. Elastic fibers of the connective tissue. In: Goldsmith LA. *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991a. Pp 530-557.

Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Chimenti S, Baker M, Limana F, Nurzynska D, Torella D, Rotatori F, Rastaldo R, Musso E, Quaini F, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 2005; 97(7):663-673.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cell characterisation and role in vascular biology. *Cir Res* 2004; 95: 324-332.

Vande Berg JS, Rudolf R, Holland C, Haywood-Reid PL. Fibroblasts senescence in pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 1998; 6: 38-49.

Vats A, Tolley NS, Polak JM, Buttery LDK. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaryngol* 2002; 27: 227-232.

Verfaillie CM. Adult stem cells: Assessing the case of pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 502-508.

Veves A, Falanga V, Armstrong DG, Sabolinski ML. A human skin equivalent is effective in the management of non infected neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2001; 24: 290-293.

Wada MR, Inagawa-Ogashima M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 2002; 129(12):29-87-2995.

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116: 639-648.

Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997; 158: 4521-4524.

Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc London- Ser B: Biol Sci* 1998; 353:831-837.

Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005; 10:209-220.

Watt SM, Fox A. Blood vessel stem cells and wound healing. *Br J Surg* 2005; 92: 1461-1463.

Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks and thresholds. *Cell* 1993; 75:1241-1244.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments and Transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.

Wenstrup RJ, Murad S, Pinnell SR. Collagen. En: Goldsmith LA (ed). *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991. Pp 481-508.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N England J Med* 2005; 353: 999-1007.

Williams RL, Hilton DL, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintain the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1998; 336: 684-687.

Woods A, Couchman JR. Syndecan 4 heparan sulphate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 183-192.

Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18:173-179.

Xu C, Inokuma MS, Denham J, Goles K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19:971-974.

Yablonka-Reuveni Z, Quinn LS, Nameroff M. Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken pectoralis muscle. *Dev Biol* 1987; 119:252-259.

Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 1994; 164:588-603.

Yamasaki H, Pagar D, Gebremedhin S. Human insulin-like growth factor-I receptor 950 tyrosine is required for somatotroph growth factor signal transduction. *J Biol Chem* 1992; 267: 20953-20959.

Yaszemski MJ, Trantolo DJ, Lewandrowski K, Hasirci V, Altobelli DE, Wise DL. Tissue engineering and novel delivery systems. En: *Principles of living organ reconstruction by tissue engineering*: Marcel Dekker, Inc. New York Basel, 2004. Pp 197-228.

Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, Ericson K, Terracio L, Asahara T, Masuda H, Tamura-Ninomiya S, Detmer K, Bray R, Steele TA, Hixson D, el-Kalay M, Tobin BW, Russ RD, Horst MN, Floyd JA, Henson NL, Hawkins KC, Groom J, Parikh A, Blake L, Bland LJ, Thompson AJ, Kirincich A,

Moreau C, Hudson J, Bowyer FP, Lin TJ, Black AC. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys* 2004 b; 40:1-80.

Young HE, Duplaa C, Young TM, Floyd JA, Reeves ML, Davis KH y cols. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat Rec* 2001a; 263:350-360.

Young HE, Steele T, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins KC. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001b; 264:51-62.

Young HE. Existence of reserve quiescent stem cells in adults, from amphibians to humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004 a; 280:71-109.

Young HE. Stem cells and tissue engineering. En *Gene Therapy in Orthopaedic and Sports Medicine* (Huard J, Fu FH, eds). Springer-Verlag, New York, 2000 pp 143-173.

Zammit PS, Beauchamp JR. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell ?. *Differentiation* 2001; 68:193-204.

Zeschnigk M, Kozian D, Kuch C, Schmoll M, Starzinski-Powitz A. Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J Cell Sci* 1995; 2973-2981.

Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signalling system and its regulator in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 2000; 30: S294-301.