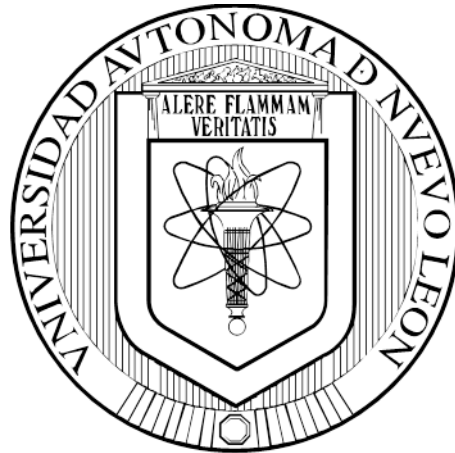


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS *in vitro* DEL POTENCIAL ANGIOGÉNICO DE LAS CÉLULAS TRONCALES DE LA FRACCIÓN VASCULAR ESTROMAL Y DE LA MÉDULA ÓSEA; POTENCIAL APLICACIÓN EN DISFUNCIÓN ERÉCTIL VASCULAR

POR

L.B.G. MAYRA YANETH BAZÁN ALVAREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

AGOSTO, 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**ANÁLISIS *in vitro* DEL POTENCIAL ANGIOGÉNICO DE LAS CÉLULAS
TRONCALES DE LA FRACCIÓN VASCULAR ESTROMAL Y DE LA
MÉDULA ÓSEA; POTENCIAL APLICACIÓN EN DISFUNCIÓN ERÉCTIL
VASCULAR**

POR

L.B.G. MAYRA YANETH BAZÁN ALVAREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

AGOSTO, 2019

Análisis *in vitro* del potencial angiogénico de las células troncales de la fracción vascular estromal y de la médula ósea; potencial aplicación en Disfunción Eréctil vascular

Aprobación de la tesis:



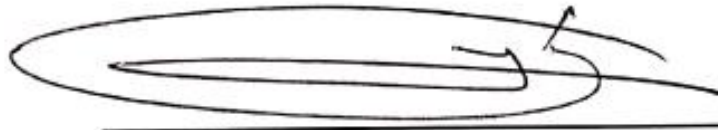
DRA. C. LIZETH ALICIA FUENTES MERA

Directora de Tesis



DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Dr. Co-director de Tesis



DR. med. LAURO SALVADOR GÓMEZ GUERRA

Miembro de la Comisión de Tesis



DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A mis padres, por mostrarme que su apoyo y amor incondicional no va a desvanecerse con el pasar del tiempo y que no importa cuánto tarde en entender algo, ellos van a estar para mí hasta que ese proceso de aprendizaje termine, sea en la obtención de un grado académico o en una lección de vida.

A mis hermanos, por siempre ofrecerme vías de escape del mundo real y abrir mi mente hacia nuevas formas de entretenimiento que hacían que el tiempo en la maestría se fuera más rápido y menos pesado.

A mi tía Nena, por siempre darme ánimos y preguntarme cómo voy con mis experimentos todos los días que nos veíamos, por dejarme desahogarme con ella y siempre tener palabras de consuelo para mí.

Gracias a todos por permitirme ser más abierta con ustedes, por siempre escuchar lo que tenía que decir cuando por fin pude hacerlo y por darme siempre su opinión cuando la pido y cuando no también. Gracias por darme la confianza de contarles todo lo que me pasa, por dejarme llorar con ustedes y ofrecerme palabras que me ayudaban a dejar de hacerlo. Los amo infinitamente a todos.

Y si tú me escuchaste hablar de mi tesis, me escuchaste llorar de estrés, me ofreciste palabras de aliento, me diste consejos o me ayudaste a distraerme en estos 2 años, esta tesis también es para ti.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi familia por todo su apoyo en estos dos años de maestría, por soportar mi mal humor en ocasiones, por su interés en mis avances y disposición de escuchar cosas que no entienden.

A mis mejores amigos Amaranta, Daniel, Carolina y Jesús, por su infinito apoyo en estos 2 años de crecimiento personal que no sólo se limita a la obtención del grado de maestría. Ustedes saben todo lo que han hecho por mí en este tiempo y no hay palabras que me permitan expresar toda la gratitud que existe en mi corazón hacia ustedes. Muchas gracias por ser los mejores amigos que pueden existir. Se llevan la mención honorífica por aguantarme en mis primeros meses de dieta y hasta hoy en día por aguantarme cuando muero de hambre.

A mis compañeros de UDM, Gaby, Francisco, Luis Ángel, Ivonne, Cecilia y Andrea, por su disposición a ayudarme en experimentos y poner su pequeño granito de arena para que esta tesis se lograra, pero, sobre todo, por su gran amistad, ya sea que haya iniciado al principio de este tiempo o más recientemente. Muchas gracias por las risas, por los memes compartidos, por las salidas, reuniones y pláticas serias que hemos tenido, son los mejores compañeros de laboratorio y ahora amigos que pude haber pedido.

A Fernando Guerra, por enseñarme que no vale la pena preocuparse tanto por las cosas, que de una u otra forma las cosas siempre salen y animarme a aplicar esta filosofía en mi vida. Gracias por escucharme hablar de mis experimentos y darme tu apoyo en mil maneras diferentes en este casi año de habernos vuelto a encontrar.

A mis compañeros de laboratorio Alex, Nidia y Vanessa, muchas gracias por trasmitirme su conocimiento y tener la disposición de enseñarme todas las cosas que sé ahora. Muchísimas gracias por no desesperarse conmigo y contestar todas mis preguntas y despejar mis dudas todas las veces que fuera necesario. Son un modelo a seguir para mí.

Al Dr. Alberto Camacho Morales por sus consejos y por proveer material que hacía falta, así como de áreas para trabajar siempre que lo necesitaba.

A la Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez por donar el medio F12 que fue utilizado en el cultivo de las células de médula ósea en el sistema Cultrex.

Al Dr. Jorge Lara Arias por su ayuda con la cirugía de las ratas, por su disposición y dedicación de tiempo a este fin, así como para la esterilización de los andamios que posteriormente fueron implantados.

Al Dr. Iván Marino Martínez por su apoyo con material, reactivos de laboratorio y la obtención de los cortes histológicos.

Al MC. Víktor Romero Díaz por su ayuda con las tinciones de los cortes histológicos, así como su interpretación y la toma de micrografías de estos.

A la Dra. Erika Coronado Cerda por su asistencia en las citometrías de flujo de las muestras utilizadas en este trabajo.

Al Dr.MC. Gabriel Ange IMecott Rivera por la donación de las muestras de grasa utilizadas en este estudio.

A la Dra. María del Consuelo Mancías Guerra por la donación de las muestras provenientes de médula ósea utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Med. Lauro S. Gómez Guerra por estar al pendiente de lo necesario para llevar a cabo el proyecto y ver siempre formas de obtenerlo.

Y, por último, a la Dra. Lizeth A. Fuentes Mera por su dirección a lo largo de todo este trabajo, por su apoyo, por la resolución de dudas y su disposición de enseñarme cosas nuevas.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
NOMENCLATURA.....	9
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Medicina Regenerativa	14
2.2 Células troncales	14
2.2.1 Clasificación de las células troncales	16
2.3 Células Troncales Hematopoyéticas (HSC)	18
2.3.1 Aspectos Históricos de las Células Troncales Hematopoyéticas	19
2.3.2 Identificación de las Células Troncales Hematopoyéticas (HSC) de acuerdo con su inmunofenotipo	20
2.4 Células Troncales Mesenquimales (MSC).....	22
2.4.1 Antecedentes históricos de las Células Troncales Mesenquimales	23
2.4.2 Identificación de las Células Troncales Mesenquimales de acuerdo con su inmunofenotipo	24
2.4.3 Fuentes de obtención de las Células Troncales Mesenquimales	25
2.5 Fracción Vascular Estromal.....	26
2.5.1 Métodos de aislamiento de la Fracción Vascular Estromal	27
2.5.2 Caracterización inmunofenotípica de la Fracción Vascular Estromal	28
2.5.3 Aplicaciones terapéuticas de la Fracción Vascular Estromal ...	29
2.6 Angiogénesis	31
2.7 Disfunción Eréctil.....	34
2.7.1 Fisiología de la erección del pene	35
2.7.2 Causas, factores de riesgo y tratamiento de la Disfunción Eréctil	36
2.7.3 Aplicación de células troncales en modelos de Disfunción Eréctil vascular en animales.....	38
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS	42

5. OBJETIVOS	43
6. MATERIALES Y MÉTODOS	44
6.1 Estandarización del aislamiento de la Fracción Vascular Estromal a partir de tejido adiposo	44
6.2 Procesamiento de las muestras de médula ósea	46
6.3 Inmunofenotipificación celular	46
6.4 Análisis de expresión mediante RT-PCR.....	48
6.5 Ensayo de formación de tubos capilares.	55
6.6 Ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i>	49
6.6.1 Construcción de andamios de fibroína	49
6.6.2 Celularización de los andamios de fibroína	50
6.6.3 Implantación de andamios celularizados	52
6.6.4 Análisis histológico	53
6.7 Análisis estadístico	55
7. RESULTADOS	57
7.1 Adaptación del aislamiento de la Fracción Vascular Estromal de tejido adiposo para su aplicación clínica.....	57
7.2 Comparación del inmunofenotipo y del perfil de expresión de factores angiogénicos de las células de la SVF vs el de las de médula ósea.....	60
7.3 Comparación de la formación de vasos sanguíneos en un modelo murino de implantación subcutánea de las células de la SVF vs. células de la médula ósea.	64
8. DISCUSIÓN	71
9. CONCLUSIONES.....	78
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantilla de anticuerpos evaluados en ambos tipos celulares.	47
Tabla 2. Secuencia de los primers diseñados para el análisis de expresión de genes angiogénicos	49
Tabla 3. Programa de temperaturas para la síntesis de cDNA	49
Tabla 4. Programa de temperaturas para las reacciones de PCR	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes	17
Figura 2. Células que componen el sistema hematolinfático	19
Figura 3. Capacidad de diferenciación de las Células Troncales Mesenquimales (MSC) a diferentes linajes	22
Figura 4. Células de la Fracción Vascular Estromal (SVF)	26
Figura 5. Capas formadas en 2 fases durante el proceso de obtención del pellet de la Fracción Vascular Estromal (SVF)	28
Figura 6. Proceso celular de angiogénesis	32
Figura 7. Resumen de las vías de señalización que apoyan el proceso de angiogénesis	34
Figura 8. Anatomía y mecanismo de la erección del pene	35
Figura 9. Cuadrícula de cámara Neubauer	51
Figura 10. Conteo de células viables	52
Figura 11. Distribución de los andamios implantados en el modelo de rata	53
Figura 12. Expresión de antígenos de superficie presentes en células aisladas con colagenasa NB6 a 0.2 y 0.1%	58
Figura 13. Imágenes representativas del cultivo primario de la Fracción Vascular Estromal (SVF)	59
Figura 14. Cultivo primario de SVF a confluencia del 80%	59
Figura 15. Comparación de marcadores presentes en la SVF en cultivo celular	60
Figura 16. Comparación de marcadores presentes en la SVF vs los presentes en médula ósea	61
Figura 17. Perfil de expresión angiogénico de las células de la médula ósea	62
Figura 18. Perfil de expresión angiogénico de las células de la SVF	63
Figura 19. Comparación del potencial angiogénico entre las células de la médula ósea y la SVF	64
Figura 20. Observación macroscópica de los andamios implantados después de 10 días	65
Figura 21. Tinciones de H&E y Tricrómico de Masson de los cortes de los andamios sin células	66
Figura 22. Tinciones de H&E y Tricrómico de Masson de los cortes de los andamios celularizados con células de la Médula Ósea	67
Figura 23. Tinciones de H&E y Tricrómico de Masson de los cortes de los andamios celularizados con células de la SVF	68
Figura 24. Comparación de la cantidad de vasos sanguíneos presentes en los andamios celularizados con células de la médula ósea y de la SVF	69
Figura 25. Imágenes de la SVF y de la MO en el sistema Cultrex a los 10 días	70

NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
ADP	Adenosín difosfato
ADSC	Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo
ANG-1	Angiopoyetina 1
ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BMSCs	Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea
BME	Extracto de Membrana Basal
BSA	Albumina Sérica Bovina
cADPR	ADP ribosa cíclica
cDNA	DNA complementario
cm	Centímetros
cm²	Centímetros cuadrados
Cofepris	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CXCL8	Interleucina 8
DE	Disfunción Erétil
DEV	Disfunción Erétil Vasular
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPC	Células Endoteliales Progenitoras
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
g	Gramos/gravedades
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GMP	Buenas Prácticas de Manufactura
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
h	Horas
HSC	Células Troncales Hematopoyéticas

ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
kg	Kilogramo
L	Litros
MAP	Proteínas Activadas por Mitógenos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mm²	Milímetros cuadrados
MO	Médula ósea
MSC	Células Troncales Mesenquimales
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NIH	Instituto Nacional de Salud
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa 5
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PECAM1	Molécula 1 de adhesión celular endotelial de plaquetas
rpm	Revoluciones por minuto
qPCR	PCR en tiempo real
RGF	Reducido en factores de crecimiento
RNA	Ácido ribonucleico
S	Segundos
SVF	Fracción Vascular Estromal
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante β
V	voltios
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
μL	Microlitros
μm	Micrómetros

RESUMEN

Introducción: La medicina regenerativa ha surgido para tratar de solventar diferentes condiciones que afectan la salud del ser humano, un ejemplo de estas son las enfermedades caracterizadas por una irrigación sanguínea inadecuada, ocasionada por una angiogénesis deficiente. Esta angiogénesis (creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes) se puede promover mediante la aplicación de Células Troncales de diferentes tipos, en este caso, de las Células Troncales Hematopoyéticas de la médula ósea y de las células contenidas en la Fracción Vascular Estromal (SVF) de tejido adiposo. En este trabajo se comparó el potencial angiogénico de ambas matrices celulares bajo diferentes esquemas, con el fin de desarrollar una metodología que pueda ser aplicada en un futuro en la clínica, más específicamente, en el contexto de la Disfunción Eréctil de etiología vascular. **Hipótesis:** Las células troncales de la Fracción Vascular Estromal derivada de tejido adiposo poseen un mejor potencial angiogénico que las células troncales hematopoyéticas derivadas de médula ósea. **Metodología:** Se adaptó un protocolo del aislamiento de la SVF y se identificaron las poblaciones celulares presentes en estas muestras y en las de médula ósea, esto mediante citometría de flujo. De la misma forma, se realizó la comparación de la expresión de los factores angiogénicos PECAM1, TGF β -1, CXCL8 Y ANGPT1 mediante RT-PCR. Así mismo, se comparó la formación de vasos sanguíneos en un modelo murino de implantación subcutánea utilizando andamios de fibroína celularizados con ambos tipos de células. Por último, se evaluó la formación de vasos sanguíneos por ambas matrices celulares en un sistema Cultrex, para evaluar el efecto de los factores solubles que eran secretados por las células, a diferencia del modelo animal. **Resultados:** Se comprobó la presencia de MSC en la SVF. La SVF presentó diferencia significativa en los marcadores mesenquimales CD73/CD105/CD90(91.3% vs37.4% en MO), mientras que ambos presentaron niveles similares de CD34 (84.5% para SVF y 82.1% para MO). El potencial angiogénico en términos de la expresión de factores angiogénicos de ambas muestras no presentó diferencias significativas. La formación de vasos sanguíneos fue significativamente mayor en los implantes celularizados con células de MO, mientras que en el sistema Cultrex estos no formaron estructuras parecidas a vasos sanguíneos, caso contrario a las de la SVF donde sí se generaron. **Conclusión:** Las células troncales de la médula ósea generaron una mayor cantidad de capilares y vasos de diverso calibre vs las células de la SVF. Sin embargo, mediante este ensayo la influencia de los factores angiogénicos solubles presentes en la SVF no ejerce su función.



DRA. C. LIZETH ALICIA FUENTES MERA

Directora de Tesis

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la medicina regenerativa está siendo ampliamente explorada para dar solución a ciertas condiciones que afectan la salud de una gran cantidad de personas a nivel mundial y, como su nombre lo indica, ésta hace uso de los mecanismos intrínsecos de la economía corporal para regenerar un órgano o tejido que ha sido lesionado. Una de las herramientas vitales en este contexto son las células troncales; las cuales son capaces de estimular y apoyar los procesos de regeneración.

Las células troncales han sido clasificadas desde varios aspectos; y en este trabajo destacamos la clasificación de acuerdo con los linajes celulares a los cuales dan origen: las Células Troncales Hematopoyéticas (HSCs) y las Células Troncales Mesenquimales (MSCs). Las primeras en utilizarse como terapia fueron las HSCs, al reportarse que el trasplante de éstas podía recuperar el número de células de la sangre en individuos afectados por la radiación hasta llegar a la cantidad normal de células. Estas células eran aisladas principalmente de la médula ósea, donde la sangre, y las principales células que la componen, son producidas. Posteriormente, fueron descubiertos los beneficios terapéuticos de las MSCs, al llevar las células de la médula ósea a cultivo celular y observar que una fracción de ellas se adhería al plástico y que eran capaces de diferenciarse hacia otros linajes distintos a los de las hematopoyéticas.

A pesar de que ambos tipos celulares fueron aislados a partir de la médula ósea, hoy en día se sabe que la frecuencia de las MSCs en la médula ósea es extremadamente muy baja, siendo de 1 por cada 10,000 células nucleadas; mientras que en otras fuentes como es el caso del tejido adiposo, su frecuencia es de 30 por cada 100 células nucleadas (Bourin et al., 2013). Es por esto que el tejido adiposo representa una fuente valiosa de MSCs y atractiva para su utilización en medicina regenerativa con aplicación clínicos.

Las MSCs forman parte de una fracción de células muy heterogénea llamada Fracción Vascular Estromal (SVF), que incluye

además de las MSCs; células progenitoras endoteliales, fibroblastos, monocitos, pericitos entre otras (Gimble et al., 2013). Es gracias a este fuerte perfil de células endoteliales y pre-endoteliales que en diversos estudios se ha demostrado que la SVF cuenta con potencial en el campo de la ingeniería de tejidos microvasculares, más específicamente en el contexto del desarrollo de un sistema vascular eficiente promotor de la angiogénesis (Jin, Chae, Son, & Kim, 2017; Leblanc et al., 2013; Maijub et al., 2015; Nunes et al., 2013).

Bajo este contexto, se propone la utilización de la SVF para tratar a la Disfunción Eréctil de etiología vascular (DEV), una condición que afecta al 29.7% de la población mexicana (Wentzell & Salmerón, 2009). Esta condición se presenta por diversas etiologías que van desde alteraciones psicológicas, neurológicas, hormonales, vasculares de tipo arterial o cavernosa o bien una combinación de varios de estos factores; finalmente lo que origina es la incapacidad de desarrollar o mantener una erección.

En la actualidad, el tratamiento de la DE está encaminado a promover, de forma temporal, la irrigación sanguínea hacia los cuerpos cavernosos del pene, lo que hace que el tratamiento de esta condición sea una terapia sintomática sin que proporcione una cura o reversión de las causas de la disfunción eréctil (Hakim, Van Der Aa, Bivalacqua, Hedlund, & Albersen, 2012). Adicionalmente, el 35% de los pacientes no responden a medicamentos de primera línea (inhibidores de la 5-PDE); estos pacientes generalmente también presentan factores como la diabetes, obesidad, tabaquismo, etc., los cuales ocasionan insuficiencia arterial del pene (Martínez-salamanca, González, Ramírez, & Angulo, 2014).

Por todo lo anteriormente mencionado, es que en este trabajo se propone comparar el potencial angiogénico que ofrece las células de la Fracción Vascular Estromal, contra el observado en las células troncales hematopoyéticas derivadas de médula ósea; y en este sentido poder determinar un mejor acercamiento terapéutico para los pacientes con Disfunción Eréctil de origen Vascular.

2. ANTECEDENTES

2.1 Medicina Regenerativa

La medicina regenerativa es un campo emergente e interdisciplinario que tiene como objetivo la reposición o regeneración de células, tejidos u órganos dañados estructural y funcionalmente; la medicina regenerativa tiene como objetivo apoyar e impulsar los propios sistemas corporales, algunas veces con ayuda de material biológico extraño, para recrear células y reconstruir tejidos y órganos. Es importante mencionar que este tipo de terapia es esencial en los casos donde los trasplantes de tejidos u órganos no son una opción de tratamiento, por ejemplo, cuando no es posible satisfacer la demanda de ciertos órganos (Mahla, 2016).

Para lograr la restauración antes mencionada, es necesario que la medicina regenerativa se apoye de otras áreas y técnicas, tales como la biología molecular, la medicina convencional y la ingeniería de tejidos con el fin de reemplazar, modificar o regenerar desde células, tejidos, hasta órganos completos (Frese, Dijkman, & Hoerstrup, 2016).

En este sentido, las células troncales juegan un papel muy importante, debido a su potencial de diferenciarse a una gran cantidad de tipos celulares; incluyendo las células que capaces de generar vasos sanguíneos, así como las células constituyentes del tejido hemático.

2.2 Células troncales

Las células troncales se definen generalmente como células indiferenciadas que son capaces de autorrenovarse mediante un proceso de división asimétrica para producir dos tipos de células hijas. Una de ellas será la nueva célula troncal, en tanto que la otra dará lugar a las células capaces de diferenciarse en linajes celulares específicos.

Además, estas células tienen como característica sobresaliente su alta proliferación

Para que estas células mantengan una alta pluripotencialidad, es necesaria la expresión orquestada de ciertos factores de transcripción a niveles muy específicos, entre los cuales destacan OCT3/4, SOX2 y NANOG. Estos factores actúan como una red interdependiente, la cual es responsable no solo de mantener la autorrenovación de las células troncales, sino también de restringir su propensión a diferenciarse en toda la gama de diferentes tipos de células que conforman las tres capas germinales embrionarias, endodermo, mesodermo y ectodermo (Rizzino, 2013).

En lo que respecta a OCT3/4, este forma parte de una familia llamada “familia de unión a octámeros”, cuyos miembros fueron identificados debido a su capacidad de unirse a un motivo de DNA de 8 pares de bases dentro de regiones regulatorias de muchos genes. Cada miembro contiene un dominio que se le conoce como “POU” (nombre que hace referencia a sus primeros miembros: Pit-1, Oct-1 y Unc-86), el cual es el encargado de la unión al DNA y está altamente conservado dentro de esta familia. Oct3/4 se expresa casi exclusivamente en células troncales durante el desarrollo, así como en algunos tumores (Rizzino, 2009). Está reportado que pequeños aumentos en los niveles de Oct4 (de aproximadamente dos veces) inducen a las células troncales embrionarias a diferenciarse en células que expresan marcadores de endodermo y mesodermo; mientras que la disminución de Oct3/4 promueve la formación de células similares al trofectodermo (Niwa et al., 2005).

En lo que respecta a Sox2, este pertenece a la familia de proteínas de caja relacionadas con la región Y determinante del sexo (SRY), la cual comprende aproximadamente 20 miembros en mamíferos. Las proteínas de tipo Sox comparten dominios de unión al DNA altamente conservados de aproximadamente 80 aminoácidos, los cuales se denominan grupos de dominios de caja de alta movilidad (HMG). Desde la clonación del

miembro prototípico de la familia SRY de los Sox, se ha demostrado que la familia Sox desempeña papeles clave prácticamente todas las etapas del desarrollo de los mamíferos durante (Kiefer, 2007). Cuando se realiza un Knock-down (eliminación de un gen) para Sox2 en células troncales embrionarias, esto promueve su diferenciación hacia células similares al trofotodermo, mientras que al aumentar Sox2 en estas mismas células (aproximadamente al doble) induce su diferenciación en células que expresan marcadores de ectodermo, mesodermo y trofotodermo, pero no endodermo (Chew et al., 2005; Kopp, Ormsbee, Desler, & Rizzino, 2008).

Nanog es un factor de transcripción que contiene un homeobox con una función esencial en el mantenimiento de las células pluripotentes de la masa celular interna y en la derivación de las células troncales embrionarias de esta. Cuando existe una sobreexpresión de Nanog, este es capaz de mantener la pluripotencia y las características autorregenerativas de este tipo de células troncales bajo lo que normalmente serían condiciones de cultivo que inducen la diferenciación. Además, las transcripciones de Nanog aparecen por primera vez en las células internas de la mórula antes de la formación del blastocisto, las cuales están restringidas a la masa celular interna en el blastocisto y ya no son detectables en la implantación. Aun así, la expresión de Nanog reaparece en el epiblasto proximal en el día embrionario 6 y permanece restringida al epiblasto a medida que avanza el desarrollo (Rodda et al., 2005).

2.2.1 Clasificación de las células troncales

Existen diferentes maneras de clasificar a las células troncales, ya sea según su origen o su capacidad para diferenciación hacia un espectro más amplio de linajes celulares. Según esta última, se clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las células totipotentes son las que tienen una capacidad de diferenciación más amplia, ya que son las que pueden derivar en tejidos tanto embrionarios

como extraembrionarios y, por ende, dar lugar a un organismo completo. Estas células provienen del cigoto y mórula en fase embrionaria (hasta 8 células). Por otro lado, las células pluripotentes son aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse hacia estructuras embrionarias provenientes del ectodermo, mesodermo y endodermo y provienen del blastocisto. Las células multipotentes son aquellas que tienen una capacidad de diferenciación un poco más limitada, ya que sólo pueden diferenciarse en células de su mismo linaje de origen embrionario. Debido a esto, estas son las denominadas células troncales adultas, ya que pueden aislarse posteriormente del nacimiento de cualquier organismo. Por último, existen las células unipotentes, las cuales solamente pueden dan lugar únicamente a un tipo de célula madura, tales como las células progenitoras endoteliales que dan lugar a las células endoteliales maduras (Figura 1) (Fortier, 2005; Zhang, Hu, & Athanasiou, 2009).

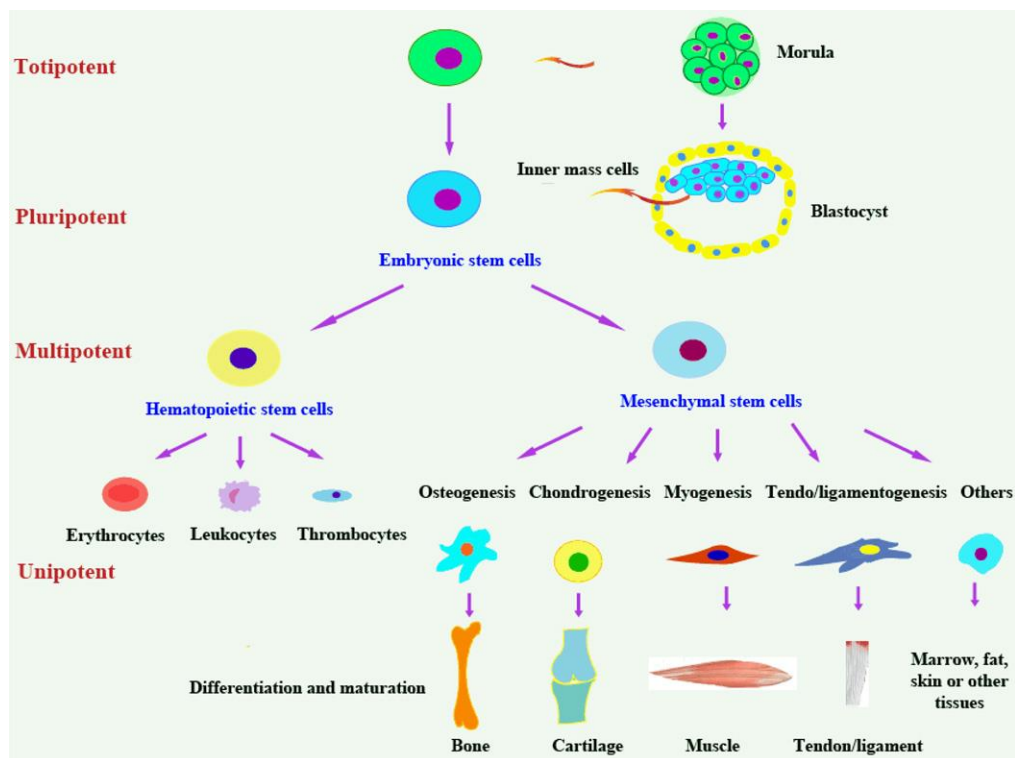


Figura 1. Células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. En "The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration" por Zhang, Hu, & Athanasiou, 2009, *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*.

La siguiente clasificación divide a las células troncales en: Células troncales hematopoyéticas y células troncales mesenquimales.

En el pasado, la médula ósea representaba la fuente más empleada de células troncales hematopoyéticas y mesenquimales. Sin embargo, el uso de las células extraídas de esta fuente está limitado por algunas desventajas: El número de células que se aísla es muy bajo en adultos, la tasa de proliferación celular es baja, y por último, el procedimiento de obtención de médula ósea es muy invasivo, lo que puede provocar morbilidad para los donantes (Can, 2008).

Por lo anteriormente mencionado, fue necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de células troncales que resulten menos riesgosas para los pacientes, así como que provean un mayor número de células que posean una proliferación más elevada y que puedan diferenciarse a los tipos celulares deseados.

2.3 Células Troncales Hematopoyéticas (HSC)

El sistema hematopoyético es el sistema encargado de producir las células componentes de la sangre. Este tejido está formado por múltiples células, las cuales tienen funciones específicas: los eritrocitos son los encargados de llevar el oxígeno a los tejidos, las plaquetas ayudan a prevenir hemorragias, los granulocitos (que incluyen neutrófilos, basófilos y eosinófilos, así como los macrófagos, ayudan a combatir infecciones de diversos orígenes, ya sea causados por bacterias, hongos o parásitos. Estas células también pueden ayudar al remodelado de tejidos y huesos y a la remoción de células muertas. Otras células que forman parte de este sistema son los linfocitos B y T, los cuales se encargan de producir anticuerpos y de matar o aislar las células reconocidas como extrañas, respectivamente (figura 2). Algunas de las células antes mencionadas tienen un periodo de vida muy corto, por lo cual es necesario reemplazarlas de manera continua. Por día, un humano necesita aproximadamente cien mil millones de células hematopoyéticas, siendo

las células encargadas de producirlas de manera continua las Células Troncales Hematopoyéticas (HSC), las cuales son de origen mesodérmico (Domen, Wagers, & Weissman, 2006; Fortier, 2005; Ulloa-Montoya, Verfaillie, & Hu, 2005).

Más recientemente se ha demostrado que las HSC muestran una plasticidad notable y aparentemente pueden diferenciarse en varios linajes de tejidos no hemolinfáticos, tales como hepatocitos, lo cual puede aplicarse en la regeneración del hígado (Lagasse et al., 2000).

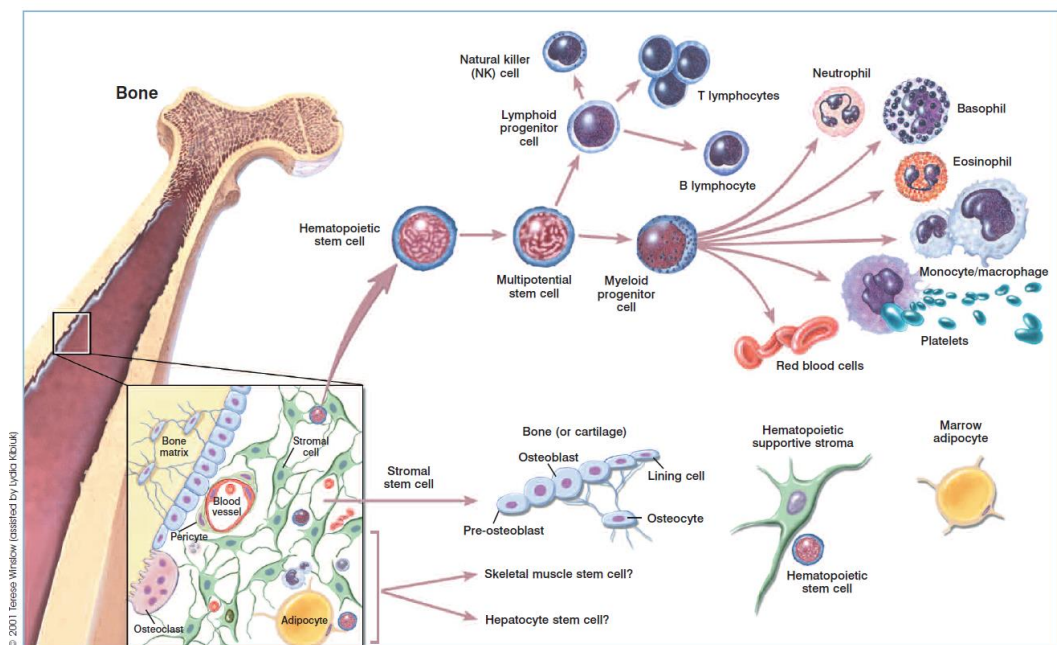


Figura 2. Células que componen el sistema hematolinfático. En "BoneMarrow (Hematopoietic StemCells" porDomen, Wagers, & Weissman, 2006,Regenerative Medicine.

2.3.1 Aspectos Históricos de las Células Troncales Hematopoyéticas

El descubrimiento de las Células Troncales Hematopoyéticas data desde los bombardeos de Hiroshima y Nagasaki en 1945. Esto fue así debido a que las personas que se expusieron a dosis bajas de radiación por largos periodos presentaban sistemas hematopoyéticos comprometidos, los cuales no podían producir el número de células necesarias para regenerar los leucocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos y linfocitos) encargados de proteger al organismo de ciertas infecciones, o producir suficientes plaquetas para coagular la sangre. Posteriormente, en

un experimento en el cual se utilizaron ratones expuestos a radiación X, se determinó que estos animales presentaban el mismo síndrome que los humanos antes mencionados y que si se protegía ya sea un solo hueso o el bazo de estos animales, se prevenía el desarrollo de este síndrome. Esto quiere decir que el sistema hematopoyético era capaz de recuperarse de este fallo antes de que fuera fatal. Es así como, tiempo después, los autores comprobaron por medio de otro experimento, que ratones que recibían radiación de cuerpo completo podían recuperarse del fallo del sistema hematopoyético utilizando una inyección de células provenientes de órganos productores de la sangre, tales como la médula ósea(Lorenz, Uphoff, Reid, & Shelton, 1951).

2.3.2 Identificación de las Células Troncales Hematopoyéticas (HSC) de acuerdo con su inmunofenotipo

Al momento de ser aisladas de la médula ósea, es posible comprobar que las células son HSC mediante algunos marcadores que expresan en su superficie, los cuales pueden ser detectados mediante citometría de flujo. Cuando estas células son de origen humano, son positivas para los marcadores (o antígenos) de superficie celular CD34,CD38, CD43, CD45RO,CD45RA, CD59, CD90, CD109, CD117, CD133,CD166, y HLA DR(Domen et al., 2006)

Uno de los marcadores más importantes es el CD34. Este es una fosfoglicoproteína transmembranal, la cual se asocia con la citoadhesión, la regulación de la diferenciación celular y la proliferación. Además, se tiene la hipótesis de que el CD34 juega un papel importante en la movilización de las HSC hacia los nichos dentro de la médula ósea. Este es un marcador muy analizado en estas células, ya que su evaluación es necesaria para asegurar un injerto rápido en los trasplantes de médula ósea (Sidney, Branch, Dunphy, Dua, & Hopkinson, 2014).

Otro marcador de gran importancia es el CD38, el cual se encontró por primera vez en la superficie de los linfocitos T, donde se determinó que este tenía un patrón de distribución un tanto única al ser

predominantemente expresado por células progenitoras y células hematopoyéticas tempranas, luego se perdía durante la maduración de estas y se reexpresaba durante la activación celular. Debido a esto, este marcador ha sido usado primordialmente como un marcador fenotípico de diferenciación en células normales y células sanguíneas leucémicas. Aparte de esto, se ha encontrado que este antígeno tiene actividad enzimática, la cual cataliza la conversión del NAD⁺ a cADPR y su hidrólisis hacia ADP-ribosa. Este es un marcador cuya expresión varía significativamente con la edad. Se ha reportado que aproximadamente el 90% de los linfocitos circulantes en niños recién nacidos son CD38⁺ y que el 50-60% permanecen positivos durante los primeros 6-10 años de vida. En adultos las células que lo expresan son las células Natural Killer, las células T y B, macrófagos, monocitos, plaquetas y eritrocitos (Mehta, Shahid, & Malavasi, 1996).

Respecto al CD45, se sabe que es una de las glicoproteínas de superficie celular más abundantes en la superficie celular de los leucocitos y que se expresa exclusivamente en células del sistema hematopoyético. Este marcador también ha sido reportado por su actividad de tirosina fosfatasa, la cual está relacionada con el mecanismo regulatorio necesario para controlar el crecimiento y la división de células eucariotas. Además, existe evidencia de que el CD45 juega un papel importante en la proliferación estimulada por antígeno de los linfocitos T y en el desarrollo del timo (Trowbridge & Thomas, 1994).

El CD117, también llamado como receptor del factor de células troncales o c-Kit, es una glicoproteína transmembranal que tiene actividades de receptor de tipo tirosina cinasa, el cual tiene la capacidad de autofosforilar en residuos de tirosina. Este marcador se expresa en células hematopoyéticas, así como en diferentes tejidos no hematopoyéticos e incluso en tumores. En la médula ósea, este marcador se expresa específicamente en células progenitoras y, al madurar, su expresión baja, excepto en los mastocitos que retienen altos niveles de expresión de este marcador (Edling & Hallberg, 2007).

2.4 Células Troncales Mesenquimales (MSC)

Las células troncales mesenquimales (MSC), más correctamente denominadas como “células estromales mesenquimales multipotentes” por la International Society for Cellular Therapy (ISCT) (Dominici et al., 2006), son células de morfología fibroblastoide que residen en diferentes tejidos de los cuales pueden ser aisladas, los cuales serán mencionados más adelante. Cabe mencionar que las células denominadas como “estromales” son células del tejido conectivo de cualquier órgano. Estas células pueden diferenciarse en fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y células de músculo esquelético tradicionalmente, sin embargo, se ha encontrado evidencia que dependiendo del nicho perivascular de donde se obtengan estas células y bajo condiciones y estímulos específicos, estas células pueden diferenciarse en células endoteliales, odontoblastos y hasta neuronas (Figura 3) (Oh & Nör, 2015; Phinney & Prockop, 2007).

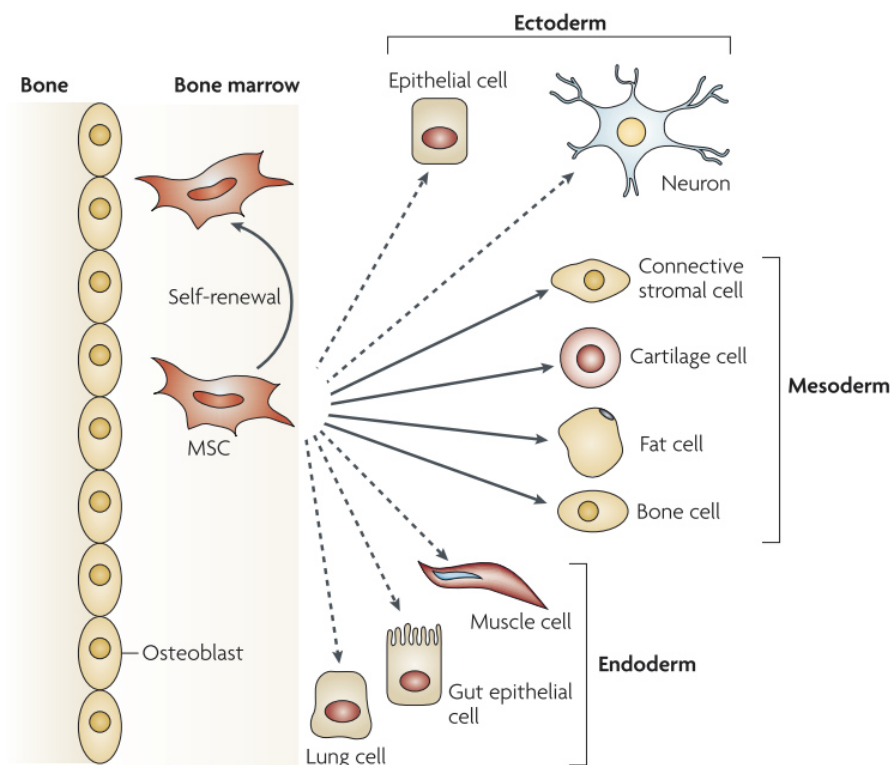


Figura 3. Capacidad de diferenciación de las Células Troncales Mesenquimales (MSC) a diferentes linajes. En “Mesenchymal stem cells in health and disease” por Uccelli, Moretta y Pistoia, 2008, Nature Reviews Immunology.

2.4.1 Antecedentes históricos de las Células Troncales Mesenquimales

En 1867 es el año en que se documenta por primera vez la presencia de células troncales no hematopoyéticas en la médula ósea. Esta aportación fue realizada por el patólogo alemán Julius Cohnheim, el cual inyectó un colorante en el torrente sanguíneo de algunos animales y observó que ciertas células inflamatorias, así como células adherentes de forma fibroblastoide migraban por medio de extravasación hacia los sitios donde existía una lesión. Debido a este y otros estudios, él llegó a la hipótesis de que las células no hematopoyéticas derivadas de la médula ósea podían migrar a través de los vasos sanguíneos hacia sitios dañados y participar en procesos de regeneración de tejidos, basándose en la creencia de que todas las células se originaban de la sangre y, por lo tanto, de la médula ósea (Hernigou, 2015).

Casi 100 años después, Friedenstein y colaboradores evidenciaron que la médula ósea contiene células que pueden diferenciarse en otras células de tipo mesenquimal, así como fibroblastos, al cultivar médula ósea completa en cajas de cultivo de plástico y después de 4 horas, remover todas las células no adherentes, eliminando así las células hematopoyéticas del cultivo. De esta forma, ellos reportaron que las células restantes en el cultivo (adherentes) eran heterogéneas en apariencia, aunque la mayoría poseían forma de huso. Después de varios pasajes, estos cultivos se volvieron morfológicamente más homogéneos, manteniendo la forma fibroblástica. Así mismo, ellos encontraron que las células aisladas podían diferenciarse en colonias que se parecían a pequeños depósitos de cartílago o hueso, lo cual ha sido reportado por otros grupos de investigación desde entonces, comprobando así que las células aisladas por el método de Friedenstein y colaboradores eran multipotentes y podían diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Es por esto por lo que se les llamó Células Troncales Mesenquimales. No obstante, a pesar de haber sido aisladas por primera vez de la médula ósea, las MSCs provenientes de esta fuente

representan solamente 1 en 10,000 células nucleadas (Chamberlain, Fox, Ashton, & Middleton, 2007).

2.4.2 Identificación de las Células Troncales Mesenquimales de acuerdo con su inmunofenotipo

De acuerdo con la ISCT, los criterios que deben cumplir estas células para poder ser catalogadas como células troncales mesenquimales son: presentar una morfología fibroblástoide, poseer la capacidad de adherirse al plástico y contar con la capacidad de diferenciarse hacia 3 linajes específicos, que son adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Como parte de su caracterización, se considera además que $\geq 95\%$ del total de las células debe expresar ciertos marcadores (o antígenos) de superficie que pueden analizarse mediante citometría de flujo, tales como CD105, CD73, CD90, mientras que no deben de expresar ($\leq 2\%$ de la población total) los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II (Dominici et al., 2006). Este último punto es en el caso de humanos.

CD90, también llamada Thy-1, es una glicoproteína anclada a glicosilfosfatidilinositol, la cual se expresa en diferentes tipos de células, por ejemplo, células T, neuronas, fibroblastos, timocitos, células troncales de la sangre y células endoteliales. La activación de este marcador puede promover la activación de las células T, además de tener efecto en algunos procesos no inmunológicos, tales como adhesión celular, la inhibición del crecimiento de neuritas, migración, muerte celular, así como la inhibición del crecimiento de tumores y la proliferación y migración de fibroblastos. Lo anterior indica que este marcador es un regulador importante de las interacciones célula-célula, y de la célula con la matriz extracelular (Rege & Hagood, 2006).

El marcador CD105, también llamado endoglina, está clasificado como un receptor accesorio del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), como se mencionará más adelante, y está reportado que se expresa en células endoteliales. Su expresión en estas células es alta

cuando se encuentran en un proceso activo de proliferación. Así mismo, este marcador ha sido propuesto como un marcador apropiado para la angiogénesis así como la neovascularización, la cual involucra la remodelación de la matriz extracelular la proliferación y la migración de células endoteliales (Nassiri et al., 2011).

CD73 es una glicosilfosfatidilinositol nucleotidasa anclada a las membranas de las balsas lipídicas, que cuando se activa en su forma homodimerizada, cataliza la hidrólisis extracelular de monofosfato de adenosina en adenosina. Este marcador se expresa en linfocitos y células endoteliales y epiteliales, en las cuales se ve involucrado en la regulación del transporte de iones, en la función de la barrera celular endotelial, homeostasis endotelial y la protección contra la isquemia. De la misma forma, también tiene un rol importante en la inmunidad al regular de manera negativa los efectos de la proinflamación del ATP extracelular. Asimismo, este marcador se ha encontrado sobreexpresado en algunos tipos de cáncer, tales como leucemia, melanoma, glioblastoma, cáncer de vejiga, de colon, de ovario y de seno (Allard, Turcotte, & Stagg, 2012).

2.4.3 Fuentes de obtención de las Células Troncales Mesenquimales

Las MSC residen en diversos tejidos, los cuales se encuentran distribuidos en el cuerpo humano adulto y estas poseen la habilidad de regenerar tipos celulares específicos para estos tejidos. Algunos ejemplos de estas fuentes son periosteo, músculo esquelético, dermis, pericitos, sangre, hueso trabecular, cordón umbilical, tejido sinovial, sistema circulatorio, pulpa dental, fluido amniótico, médula ósea y tejido adiposo, así como diferentes tejidos de feto, como sangre, hígado y pulmón.

En el pasado, la fuente más utilizada para el aislamiento de este tipo de células era la médula ósea, sin embargo, la cantidad de células troncales mesenquimales que se aísla de esta fuente es muy pequeña, siendo de 1 por cada 10,000 células nucleadas. Es por esto que se ha decidido analizar otras fuentes de obtención, como el tejido adiposo,

donde la frecuencia de las células es de 30 por cada 100 (Bourin et al., 2013; Chamberlain et al., 2007). Además, el proceso de obtención de médula ósea en humanos es doloroso y riesgoso, mientras que un procedimiento de liposucción sería más conveniente al no ser tan invasivo. A estas células se les llama Células Troncales Mesenquimales Derivadas de Tejido Adiposo (ADSC) y forman parte de una fracción celular llamada Fracción Vascular Estromal (SVF). Para aislar las ADSC de esta fracción es necesario llevarla a cultivo celular, donde las ADSC harán uso de su capacidad de adherirse al plástico de la caja de cultivo, haciendo posible eliminar las demás células al retirar el medio de cultivo y cambiarlo por nuevo (Bourin et al., 2013).

2.5 Fracción Vascular Estromal

La fracción vascular estromal (SVF) presente en el tejido adiposo se define como una mezcla heterogénea de células, que además de las ADSCs, incluye células progenitoras endoteliales (EPC) y endoteliales maduras, fibroblastos, macrófagos, células del músculo liso, monocitos, linfocitos, pericitos, pre-adipocitos, eritrocitos, entre otras (Figura 4)(Bora & Majumdar, 2017). Esta heterogeneidad celular es una de las dos ventajas principales que presenta la utilización de la SVF en comparación con las ADSCs, debido a que en diferentes ensayos con animales se ha concluido que esta heterogeneidad es la responsable de generar un mejor resultado terapéutico en comparación con las ADSC (Charles-De-Sá et al., 2015; Semon et al., 2013; Van Dijk et al., 2011; You et al., 2015).

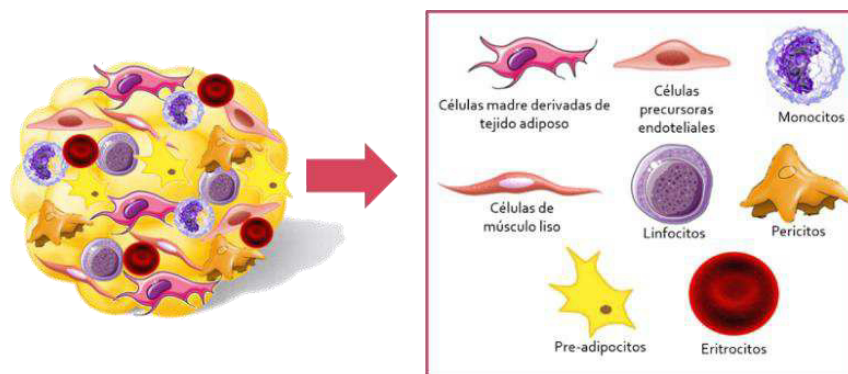


Figura 4. Células de la Fracción Vascular Estromal (SVF).

La segunda ventaja es su obtención mediante métodos simples, ya que su utilización es directa, sin pasos previo de cultivo celular; esto en términos logísticos acorta el tiempo de espera para su utilización, así como la exposición con elementos de origen animal como el suero fetal bovino.

Este último punto es de vital importancia, ya que es deseable que las células sean mínimamente manipuladas para poder cumplir con los lineamientos de la FDA o, en el caso de nuestro país, de la COFEPRIS, para su utilización con fines clínicos.

2.5.1 Métodos de aislamiento de la Fracción Vascular Estromal

El método principal para el aislamiento de la fracción vascular estromal (SVF) es el método enzimático, en el cual se utilizan enzimas como la colagenasa, donde se separa el contenido en dos fases: la fase que contiene adipocitos maduros y se encuentra flotando en el tubo y los componentes celulares que son de interés en la fracción acuosa que se encuentra debajo (Figura 5). Existen diferentes métodos que pueden servir de apoyo para lograr esta separación, tales como la separación de fases basada en gravedad, la filtración o la centrifugación. La más utilizada es la centrifugación, aunque esta técnica va a mandar al pellet todas las células presentes y no sólo las de interés, por ejemplo, eritrocitos presentes en la muestra. Ante esto, la filtración tiene una ventaja, ya que puede diseñarse para capturar sólo las células importantes discriminándolas por su tamaño, haciendo así más específico el proceso de obtención. Sin embargo, si se utiliza la centrifugación es posible lisar los eritrocitos presentes en el pellet utilizando un buffer de lisis de eritrocitos (Bora & Majumdar, 2017).

Otro método de obtención de la SVF son los no enzimáticos, los cuáles son útiles debido a interrogantes acerca de las regulaciones de los métodos enzimáticos. Muchas de las técnicas empleadas incluyen agitación mecánica, la cual rompe el tejido adiposo y libera las células

estromales. Sin embargo, el rendimiento celular de este tipo de métodos es más bajo en comparación con los enzimáticos, ya que las células del tejido adiposo se encuentran fuertemente unidas por colágeno y las fuerzas mecánicas no son suficientes para liberarlas (Aronowitz, Lockhart, & Hakakian, 2015).

Asimismo, se han diseñado diferentes dispositivos para la obtención de la SVF de manera automática, esto para facilitar tanto el aislamiento como la aplicación de estas células en un menor tiempo en las instalaciones del cuidado de la salud donde se realizan este tipo de tratamientos relacionados con la cirugía estética. Algunos de estos dispositivos ya se utilizan en la práctica, mientras que otros aún no salen al mercado, pero la mayoría se basa en la digestión del tejido adiposo mediante métodos enzimáticos, así como la filtración (Rodríguez et al., 2017).

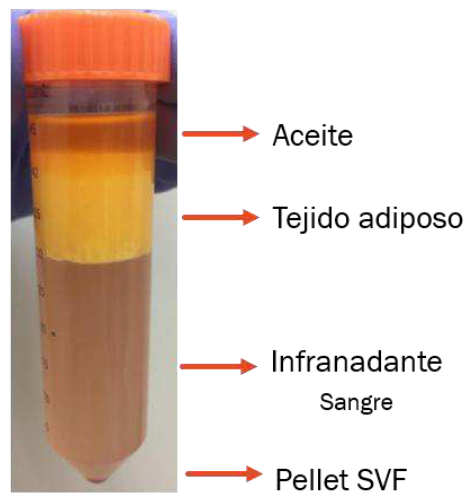


Figura 5. Capas formadas en 2 fases durante el proceso de obtención del pellet de la Fracción Vasculor Estromal (SVF).

2.5.2 Caracterización inmunofenotípica de la Fracción Vasculor Estromal

La International Society for Cellular Therapy (ISCT) establece que la SVF varía en su heterogeneidad, más específicamente en la expresión de marcadores de superficie celular en las células aisladas, dependiendo de qué parte del cuerpo se obtenga la muestra de grasa a analizar, así

como del protocolo en general que se sigue para la digestión enzimática. Sin embargo, existen rangos de ciertos marcadores que se manejan y se consideran puntos de control en el aislamiento de la SVF.

En lo referente a marcadores positivos para las células estromales, se tiene que el CD13, CD29, CD44, CD73 y CD90 deben encontrarse expresados en un rango $>40\%$, mientras que el CD34 debe encontrarse en un rango $>20\%$.

En cuanto a los marcadores negativos para estas mismas células, el CD31 debe encontrarse en un rango $<20\%$, mientras que el CD45 debe encontrarse en un rango $<50\%$ (Bourin et al., 2013).

2.5.3 Aplicaciones terapéuticas de la Fracción Vascular Estromal

Las primeras aplicaciones clínicas que se le dio a la SVF fueron reportadas alrededor de 2007 y 2008 para aplicaciones cosméticas, más específicamente aumento de senos, así como para el tratamiento de lesión por radiación posterior a la radioterapia, esto en pacientes con cáncer de seno. Esto se realizaba para enriquecer los injertos que se iban a implantar con el fin de favorecer la retención de estos, cosa que se comprobó. A partir de estas aplicaciones, se aumentaron exponencialmente los estudios en ciencia básica donde se analizaba a esta fracción, así como los estudios clínicos. Existen estudios clínicos en varias enfermedades donde se ha probado la efectividad de las células de la SVF, tales como enfermedades pulmonares, enfermedad de Crohn, regeneración de nervios periféricos y enfermedades vasculares y arteriales (Bora & Majumdar, 2017).

En relación con el tratamiento de enfermedades vasculares y arteriales, la SVF puede regenerar tejidos a través de varios mecanismos, entre los cuales se destaca el de promover la angiogénesis. Esto se lleva a cabo gracias a la acción de ciertos roles que juegan las células contenidas en ella, tales como la secreción de ciertos factores de crecimiento, destacando al Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

(VEGF), la presencia de células progenitoras endoteliales que posteriormente forman los vasos sanguíneos, así como la capacidad de las ADSCs de actuar como pericitos (células que recubren los vasos sanguíneos) (Dykstra et al., 2017).

Existen diversos estudios en los cuales se ha demostrado, tanto en modelos animales como *in vitro* que la SVF es una buena opción para promover la angiogénesis en diferentes condiciones, tales como isquemia de extremidades, infarto al miocardio, isquemia generalizada y enfermedades del hígado. (Jin et al., 2017; Leblanc et al., 2013; Majjub et al., 2015; Nunes et al., 2013).

En el caso de la isquemia, se realizó un estudio donde se caracterizaron las propiedades angio-vasculogénicas de la SVF humana en esta enfermedad. Para esto, se llevaron a cabo análisis mediante citometría de flujo, microarreglos, qPCR, ensayos de matrigel y ensayos *in vivo* en un modelo de ratón con isquemia de extremidades. Los resultados encontrados sugieren que los factores angiogénicos analizados (VEGF-A, ANG-1, CTGF, FGF-2, IGF-1, IL-8, PDGF-b) se encontraban altamente expresados en las células de la SVF en comparación con los de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo, además de que la SVF exhibió alta expresión de genes específicos de endotelio y mostró una formación vascular robusta *in vitro*. Una vez que se trasplantaron estas células al modelo animal, se concluyó que la SVF trasplantada prevenía la pérdida de la extremidad y aumentaba la perfusión sanguínea (Jin et al., 2017).

En lo referente a infarto, existe un estudio donde se investigó el potencial de recuperación cardiaca de un constructo con SVF, el cual se implantó en un infarto ya establecido, esto en un modelo de rata. Para esto, se recolectó el tejido adiposo proveniente de ratas, se cultivó sobre una sutura Vicryl durante 14 días y se hicieron 4 grupos, uno donde se analizó a las 6 semanas de establecido el infarto pero no se aplicó nada, uno donde se aplicó el constructo con SVF a las 2 semanas, otro donde se aplicó la sutura por sí sola a las 2 semanas y por último, uno de infarto

establecido, pero detenido a las 2 semanas, que fue el tiempo donde se realizó la intervención. En este estudio, se encontró que había más cantidad de vasos sanguíneos, así como mayor porcentaje de perfusión en los animales tratados con el constructo de SVF (Leblanc et al., 2013).

En otro estudio, se analizó el potencial de la SVF de promover la integración de la microcirculación entre las células implantadas y el hospedero. Para esto, se utilizaron células de la SVF para vascularizar un implante que contenía células de humanas de hígado de la línea celular HepG2. En este, se analizaron las características y la extensión de las neovasculaturas formadas por tanto las células de la SVF recién aisladas, como de las células de esta fracción que ya habían pasado por cultivo celular. Los resultados mostraron que las células de la SVF recién aisladas poseían un potencial de vascularización más elevado (Nunes et al., 2013)

2.6 Angiogénesis

La angiogénesis puede definirse como el crecimiento de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos existentes. Este evento es mediado por un proceso complejo de múltiples pasos, los cuales comienzan con un estímulo angiogénico dentro de la célula endotelial ocasionado por la unión de ciertos factores angiogénicos (como VEGF, Ang-1, PDGF, TGF- β , etc.) a sus respectivos receptores, ocasionando un aumento en la permeabilidad y en la proliferación celular. Posteriormente, se da la proteólisis de la membrana basal por metaloproteinasas de la matriz para promover la invasión de las células endoteliales en el estroma del tejido cercano. Luego se define un punto de ramificación donde se van a establecer las células endoteliales, las cuales proliferan y migran hacia la matriz extracelular para formar una estructura multicelular. Por último, se tiene el capilar formado, con lumen central, el cual es estabilizado mediante la construcción de la membrana basal correspondiente, el establecimiento de uniones adherentes y células endoteliales (Yoo & Kwon, 2013). Estos pasos se ilustran en la figura 6.

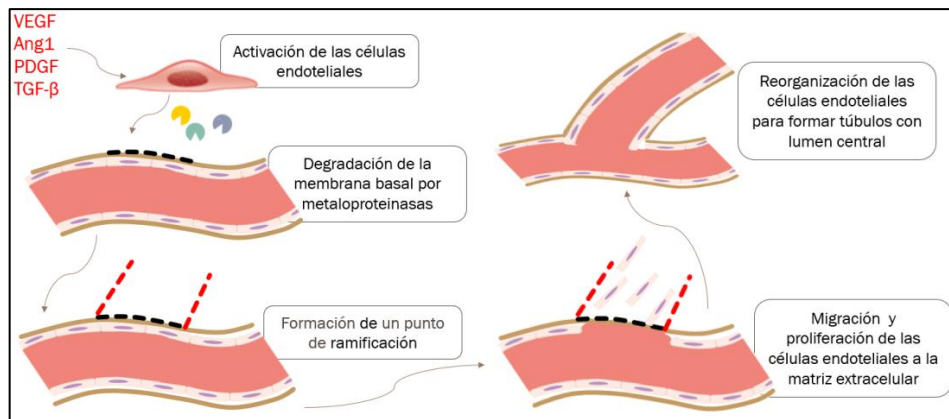


Figura 6. Proceso celular de angiogénesis.

A nivel molecular, los factores angiogénicos antes mencionados activan algunas vías de señalización que están involucradas con la proliferación, migración y supervivencia celular, las cuales son fundamentales para que se lleve a cabo todo el proceso de angiogénesis antes mencionado.

Por una parte, el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), al interactuar con su receptor (VEGFR) activa la vía de señalización de PI3K-Akt, la cual está encargada de la proliferación, supervivencia y permeabilidad celular necesarias para el proceso de angiogénesis. Otra vía que se activa es la de la liberación del calcio mediante la conversión del fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) en inositol trifosfato (IP3) por la fosfolipasa C (PLC), la cual también está involucrada en aumentar la permeabilidad. Por último, otra vía relacionada con el proceso de angiogénesis que se activa mediante la interacción de VEGF con su receptor es la de las MAP cinasas (MAPK), la cual culmina con la transcripción de ciertos genes que promueven la proliferación celular (Cross & Claesson-Welsh, 2001).

La Angiopoyetina 1 (Ang-1) interactúa con su receptor Tie2 y al igual que el VEGF, activa la vía de señalización de PI3K-Akt, encargada de la proliferación, supervivencia y permeabilidad de las células endoteliales, como se mencionó anteriormente. Asimismo, también activa la vía de las MAP cinasas para promover la proliferación celular por medio de la activación de algunos genes (Fagiani & Christofori, 2013). Por

último, su interacción con el receptor recluta a Dok-R, una proteína de acoplamiento (docking protein), la cual mediante esta unión exhibe sitios de unión con la proteína adaptadora Nck. Esta proteína puede asociarse con la proteína efectora PAK, que es una serina/treonina cinasa encargada de promover la proliferación y migración de las células endoteliales, siendo de esta manera que participa en el proceso de angiogénesis (Master et al., 2001).

El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) se une a su receptor PDGFR e inicia con la vía de señalización activando a Ras mediante SOS, lo cual activa la vía de PI3K, activando a la proteína cinasa PKB/Akt y esta a su vez a la proteína cinasa I κ B (IKK), culminando con la activación de NF- κ B y la subsiguiente activación del proto-oncogén c-myc, el cual funciona como factor de transcripción y está encargado de transcribir ciertos genes involucrados en la supervivencia y proliferación celular, lo cual es importante en el proceso de angiogénesis (Romashkova & Makarov, 1999). Asimismo, otra vía que se activa cuando PDGF interactúa con su receptor es la vía de las MAPK, cuya finalidad es promover la proliferación celular (Morrison et al., 1989).

En células que expresan endoglina (CD105), TGF- β , cuando es activado por proteasas o trombospondinas, se une al receptor homodímero T β R-II, el cual recluta el receptor ALK1, así como a la endoglina en su forma dimérica, todo esto para formar un complejo de receptores. Esto ocasiona que T β R-II fosforile a ALK1 en un dominio muy conservado y rico en glicina/serina, causando un cambio conformacional en el receptor. Esta señal es propagada al núcleo mediante la fosforilación de ciertas proteínas Smad (tales como la 1/5 y la 4), que actúan como coactivadores o correpresores de la transcripción de algunos genes involucrados en la angiogénesis (Dallas et al., 2008).

Todas las vías antes mencionadas están ilustradas de una manera resumida en la figura 7.

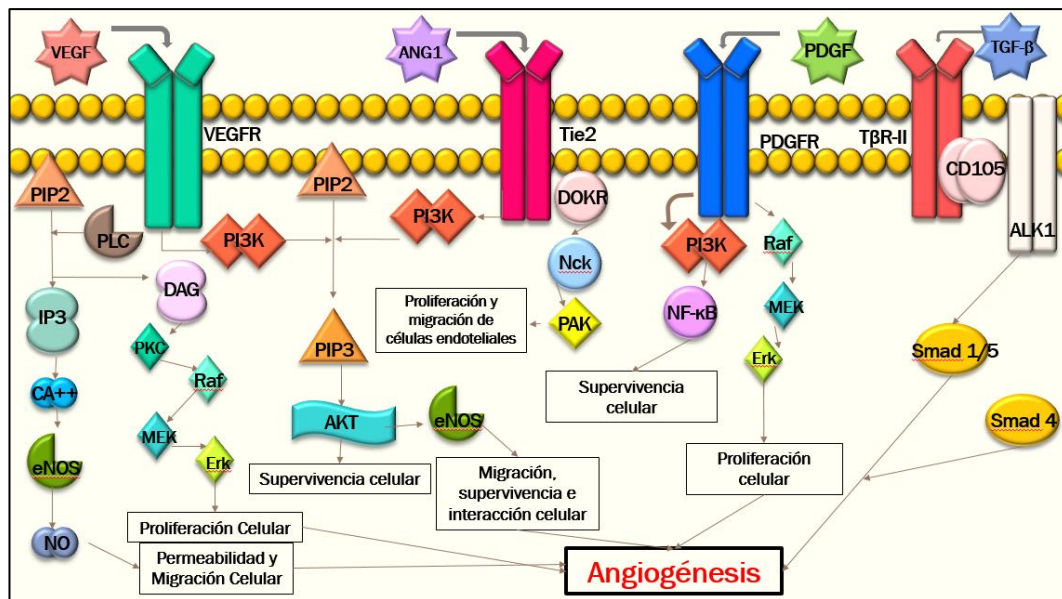


Figura 7. Resumen de las vías de señalización que apoyan el proceso de angiogénesis

La angiogénesis juega un papel fundamental en varios procesos fisiológicos del cuerpo humano, los cuales comprenden desde el desarrollo fetal, hasta la reparación de tejido después de un trauma, además de estar involucrado en el ciclo menstrual, cáncer y algunas enfermedades inflamatorias e isquémicas, como se mencionó con anterioridad.

Otra enfermedad o condición producida por una angiogénesis deficiente que se busca tratar con este acercamiento es la Disfunción Eréctil de etiología vascular, la cual puede presentarse, entre otras cosas, como un efecto secundario de la Diabetes.

2.7 Disfunción Eréctil

La Disfunción Eréctil (DE) se define como la incapacidad persistente para lograr o mantener una erección de suficiente rigidez para permitir relaciones sexuales exitosas (NIH Consensus Development Panel on Impotence, 1993). Esta enfermedad tiene una prevalencia de aproximadamente 12.9% en Europa del sur en la población masculina en general, mientras que en países de habla inglesa esta es del 20.6%

(Colson, Cuzin, Faix, Grellet, & Huyghes, 2018). En el caso de México, esta condición tiene una prevalencia del 29.7% en hombres de entre 40 y 60 años, lo cual fue determinado en un estudio realizado en Cuernavaca (Wentzell & Salmerón, 2009).

2.7.1 Fisiología de la erección del pene

Una erección peneana es un evento modulado por factores psicológicos y el componente hormonal. Cuando ocurre la estimulación sexual, los impulsos nerviosos causan la liberación de neurotransmisores de las terminales del nervio cavernoso y de factores relajantes de las células endoteliales del pene, ocasionando la relajación del músculo liso dentro de las arterias y arteriolas que irrigan el tejido eréctil y un aumento considerable en el flujo de sangre al pene. Al mismo tiempo, la relajación del músculo liso trabecular aumenta la distensión de las sinusoides, facilitando el rápido llenado y expansión del sistema sinusoidal. Por ende, los plexos venosos subtunicales que se encuentran entre las trabéculas y la túnica albugínea se comprimen, lo que da como resultado una oclusión casi total del flujo venoso. Estos eventos atrapan la sangre dentro de los cuerpos cavernosos y elevan el pene desde una posición dependiente (en reposo) a una posición erecta (Figura 8) (Lue, 2000).

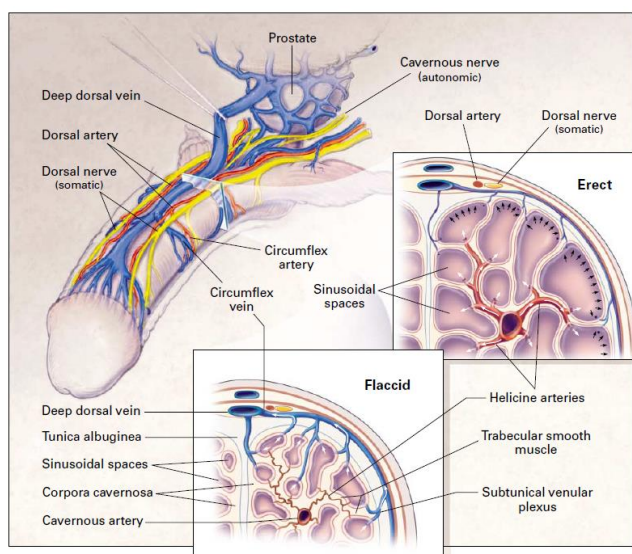


Figura 8. Anatomía y mecanismo de la erección del pene. En "Erectile Dysfunction" por T. F. Lue, 2000, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 342, p. 1803

2.7.2 Causas, factores de riesgo y tratamiento de la Disfunción Eréctil

Tomando en cuenta diferentes causas o factores de riesgos asociados a la aparición de la DE, esta puede clasificarse en 3 categorías, la psicogénica, la orgánica (que incluye la DE neurogénica, hormonal, vascular o cavernosa y la inducida por medicamentos o drogas) o una mezcla de ambas, la cual es la más común (Lue, 2000). En este trabajo nos enfocaremos en la DE de etiología vascular o cavernosa.

Algunos factores que pueden causar DE vascular son hipertensión, hiperlipidemia, tabaquismo, diabetes mellitus y obesidad, ya que estos factores están asociados a la insuficiencia arterial del pene. Esto es así debido a que las afecciones vasculares ocasionadas por los factores anteriormente mencionados están relacionadas con la alteración de la señalización del óxido nítrico (NO). Cuando la disponibilidad del NO se reduce en el tejido eréctil, esto conlleva a una inadecuada relajación del músculo liso del pene y, por lo tanto, a la DE vascular. Tanto la obesidad como la hipertensión pueden causar aterosclerosis o isquemia vascular, lo que a su vez provoca alteraciones en la circulación arterial del pene y, por último, DE. En el caso de la diabetes, la vía de señalización del NO/GMPc es defectuosa, lo que conlleva a la alteración de la circulación arterial del pene generando DE. El tabaquismo y la hiperlipidemia inhiben la relajación dependiente del endotelio, ocasionando así DE (Martínez-salamanca et al., 2014).

La elección del tratamiento de la DE debe ser acorde con la causa u origen de esta condición, ya que el principal objetivo es curarla y no solamente tratar los síntomas. En algunos casos, la DE está asociada a factores modificables o reversibles, factores relacionados con los hábitos de vida o con algunos medicamentos, tal y como se mencionó anteriormente. En estos casos, se pueden modificar tales factores antes de utilizar un tratamiento concreto.

Por lo anteriormente mencionado, únicamente es posible curar aquella DE originada por desórdenes hormonales, la de origen

psicogénica y la que es ocasionada por complicaciones de una lesión en pacientes jóvenes, ya que es posible utilizar un tratamiento específico para resolver la causa del desarrollo de esta condición (Wespes, Amar, Eardley, Giuliano, & Hatzichristou, 2010).

Los tratamientos de primera línea que se utilizan para tratar esta condición en pacientes que no entran en las categorías anteriores, son aquellos que se administran por vía oral, siendo los inhibidores de la enzima fosfofodiesterasa-5 (5-PDE) los mayormente utilizados. Estos fármacos no son iniciadores de la erección por sí solos, ya que su mecanismo de acción requiere que exista estimulación sexual previa. Este mecanismo se basa en que estos compuestos son análogos del GMPc, siendo ambos reconocidos por la enzima 5-PDE encargada de hidrolizar originalmente al GMPc, lo que resulta en la competición por el sitio activo de la enzima por parte de ambos compuestos y finalmente en la inhibición de la enzima. Al inhibir la enzima antes mencionada, se da la acumulación del GMPc y se retarda el tiempo en que este será hidrolizado, aumentando así el flujo arterial y provocando la consecuente relajación del músculo liso, la vasodilatación y, por último, una erección más duradera.

Actualmente, la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado 4 fármacos que actúan bajo este mecanismo: sildenafil, tadalafil, vardenafil y avanafil (Bayer HealthCare Pharmaceuticals, 2010; Eli Lilly and Company, 2011; Pfizer Labs, 2010; VIVUS Inc., 2012).

A pesar de contar con todas estas opciones, existen pacientes que no responden a estos tratamientos de primera línea. Estos pacientes representan aproximadamente el 35% de los afectados, porcentaje que va en aumento significativo en ciertos sectores de la población. Tal es el caso de los pacientes con diabetes, enfermedad que también va en aumento considerable en nuestro país, propiciando la aparición y el aumento en la prevalencia de DE de origen vascular (Martínez-salamanca et al., 2014).

Debido a lo anteriormente mencionado, es que se ve a la estimulación de la angiogénesis en los cuerpos cavernosos del pene como un acercamiento con buen potencial para restaurar la función eréctil en este tipo de sujetos afectados, esto a través de la aplicación de la Fracción Vasculor Estromal, que entre las células que la componen tenemos a las Células Troncales Mesenquimales.

2.7.3 Aplicación de células troncales en modelos de Disfunción Eréctil vascular en animales

En 2006 se llevó a cabo un estudio en el que se inyectaron BMSCs con la enzima eNOS modificada en ratas de 25 meses de edad con disfunción eréctil, mejorando esta función posterior al tratamiento. Esto ocurrió tanto con las células que tenían la enzima modificada como con las que no la tenían, sin embargo, la mejora se produjo de manera más rápida con las modificadas. Esta mejora se asoció con un aumento de los niveles de proteína de eNOS, la actividad de NOS y la mejora de la integridad endotelial en el cuerpo cavernoso (Bivalacqua et al., 2006). A este respecto, en el 2010 se publicó otro estudio en el que se analizó el efecto de las BMSCs aplicadas de manera intracavernosa por un periodo de 3 a 4 meses y se observó que estas células troncales persistían en el tejido eréctil, sin embargo, no se realizó la colocalización de tales células con marcadores específicos de células endoteliales o de células del músculo liso, por lo cual no se pudo proporcionar una prueba contundente de la transdiferenciación e incorporación de las mismas, esto en un modelo de rata (Abdel Aziz et al., 2010).

En cuanto a los modelos de diabetes, se han publicado diferentes estudios, uno de los cuales fue llevado a cabo en el 2009, donde se utilizaron ADSCs autólogas en un modelo de rata con disfunción eréctil inducida por diabetes. En este, se reportó que los animales tratados con estas células mostraron respuestas eréctiles significativamente mejores ante la estimulación de los nervios cavernosos a los 21 días después de la inyección. En este estudio sólo se detectó un pequeño número de

células marcadas con Edu dentro del tejido del cuerpo cavernoso y no se observó injerto de estas células en el tejido huésped (Garcia et al., 2010).

En 2011 se analizó el efecto de una inyección intracavernosa de BMSCs en un modelo de disfunción eréctil de rata con diabetes tipo 1 inducida por estreptozocina. Los resultados arrojaron que estas células produjeron un aumento de la presión intracavernosa cuando se realizó la estimulación en los nervios cavernosos y además se determinó que se aumentó la expresión de marcadores neuronales (Qiu et al., 2011).

En un estudio de seguimiento realizado en el mismo grupo, se determinó una mejoría similar en los marcadores neuronales cuando se inyectó medio acondicionado de las células troncales en lugar de las células en sí, sugiriendo un efecto parácrino. En este caso, la aplicación de células troncales en un modelo de enfermedad del síndrome metabólico (la forma más común de disfunción eréctil observada), resultó en una mejor recuperación de la función eréctil junto con un aumento de la función endotelial y neural. Sin embargo, es importante mencionar que no se observó ningún injerto significativo de células troncales que explicara la transducción y el reemplazo del tejido enfermo como el mecanismo terapéutico de acción detrás de la función eréctil mejorada (Huang et al., 2010).

En el 2012 se publicó un estudio en el cual se aplicó la SVF recién extraída en un modelo de disfunción eréctil en ratones diabéticos inducidos con estreptozocina, esto de manera intracavernosa. Mejora significativa en la función eréctil en tratados con SVF vs no tratados. En este estudio se observó una mejora en la función eréctil en los animales tratados con la fracción posterior a la estimulación del nervio cavernoso, además de que se determinó que hubo un aumento en la proliferación celular endotelial cavernosa, así como un aumento en la fosforilación de eNOS y un aumento en los niveles de expresión del GMPc, en comparación de los grupos tratados con PBS. Asimismo, la inyección intracavernosa de la SVF aumentó la expresión del VEGF-A en los cuerpos cavernosos y se indujo el reclutamiento de células progenitoras

CD34+ y CD31-, así como se pudo determinar que algunas células de esta fracción se diferenciaron en células endoteliales cavernosas.

En conclusión, los resultados apoyan el concepto de que la Fracción Vascular Estromal (SVF) son capaces de co-adyuvar a la regeneración endotelial cavernosa y se puede proponer su uso como una posible estrategia curativa para la disfunción eréctil de etiología vascular (Ryu et al., 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la población afectada por Disfunción Eréctil (DE) de etiología vascular no responde a los tratamientos de primera línea (inhibidores de la PDE-5) y los de segunda y tercera línea son poco efectivos y dolorosos, es necesaria la generación de nuevos tratamientos que incidan en la generación de nuevos vasos sanguíneos.

El tratamiento con células troncales, más específicamente las presentes en la Fracción Vascular Estromal (SVF), representa una opción prometedora para tratar la DE de etiología vascular, ya que debido a su heterogeneidad celular provee de células tanto del linaje hematopoyético como del mesenquimal, las cuales de forma sinérgica potencialmente pueden promover la angiogénesis y revertir la condición antes mencionada. Debido a que aún falta información respecto al potencial angiogénico de la población celular aislada con la colagenasa de grado GMP NB6, es necesario llevar a cabo más estudios.

4. HIPÓTESIS

Las células troncales de la Fracción Vascular Estromal derivada de tejido adiposo poseen un mejor potencial angiogénico que las células troncales hematopoyéticas derivadas de médula ósea.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar el potencial angiogénico de las células troncales de la fracción vascular estromal de tejido adiposo contra el de las células troncales hematopoyéticas de médula ósea.

Objetivos específicos

- 1- Adaptar el proceso de aislamiento de la Fracción Vascular Estromal de tejido adiposo para su aplicación clínica.
- 2- Comparar el inmunofenotipo y el perfil de expresión de factores angiogénicos de las células de la SVF (NB6) contra el de las células troncales de la médula ósea.
- 3- Comparar la formación de vasos sanguíneos en un modelo murino de implantación subcutánea de las células de la Fracción Vascular Estromal contra las células de la médula ósea.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estandarización del aislamiento de la Fracción Vascular Estromal a partir de tejido adiposo

Las muestras de tejido adiposo fueron donadas por el servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León previo consentimiento informado, las cuales constaban de 7 muestras de 100 mL cada una. La metodología que se siguió para el aislamiento de la Fracción Vascular Estromal de estas muestras se basó en la descrita por Raposio y colaboradores en el 2015, la cual fue adaptada para cumplir con nuestras necesidades (Raposio, Simonacci, & Perrotta, 2017). Para esto, primero se preparó una solución de colagenasa NB6 GMP grade (SERVA Electrophoresis GmbH) diluyendo 1 g en 10 mL de solución salina en un baño de hielo en una campana de flujo laminar. Se tomó 1 mL de esta solución y agregaron 49 mL de PBS (0.2%, n=4) o 500 µl de la solución y 49.5 mL de PBS (0.1%, n=3) para probar ambas concentraciones. Cada muestra de lipoaspirado colectada en 2 tubos de 50 mL se lavó dos veces para eliminar la mayor cantidad de sangre posible del tejido adiposo, esto de la siguiente forma: Se centrifugó el tejido adiposo a 1,600 rpm/6 minutos y se decantó el tejido adiposo a tubos cónicos nuevos de 50 mL cuidando que no se transfiriera solución salina del fondo del tubo. Se agregó PBS hasta completar 50 mL y se centrifugó a 1,600 rpm por 6 minutos y se repitió el proceso. Posteriormente, se recuperó el tejido adiposo concentrado (entre 25 y 30 mL de grasa por cada tubo cónico de muestra) y se colocó en un frasco de plástico estéril con tapa. Para llevar a cabo el proceso de digestión enzimática, se agregaron los 50 mL finales del paso 1 al frasco. Las muestras se incubaron en una plancha agitadora a baño maría a 37°C por 30 minutos con una agitación suave y cuidando que el agua no llegara a la tapa del frasco y se pasó el contenido de los frascos a tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron nuevamente a 1,600 rpm/6 minutos. Después, se removió el aceite de la parte superior con una pipeta y se decantó la grasa. (sin eliminar el PBS). Se mezcló por inversión y se filtró

cada muestra usando filtros de 100 μm (pasándolo a un tubo nuevo de 50 mL). Se centrifugaron nuevamente a 1,600 rpm/6 minutos y se decantó el sobrenadante cuidando el pellet. Se agregaron 20 mL de PBS a cada tubo, se mezclaron por inversión y se filtraron las muestras con un filtro de 40 μm . Luego se centrifugaron nuevamente a 1,600 rpm/6 minutos, se decantó el sobrenadante y se repitió el último paso de lavado y filtrado de nuevo. Por último, se centrifugaron nuevamente a 1,600 rpm/6 minutos y se eliminó el sobrenadante.

6 de estas 7 muestras (3 al 0.2% y 3 al 0.1%) fueron conservadas en 800 μl de PBS y resuspendidas por vórtex para su posterior inmunofenotipificación mediante citometría de flujo, mientras que la muestra restante (al 0.2%) fue llevada a cultivo celular en una botella de 25 cm^2 utilizando medio DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico y antimicótico e incubada a 37°C y 5% de CO_2 para comprobar la presencia de células troncales mesenquimales de tejido adiposo en esta. Después de 1 semana se le realizó el primer cambio de medio, el cual fue realizado cada 3er día de la siguiente manera: En una campana de flujo laminar se le retiraron los 6 mL de medio sucio a la botella de 25 cm^2 utilizando una pipeta de 10 mL, posteriormente se lavó con 2 mL de PBS, se retiró con una pipeta de 5 mL y se agregaron 6 mL de medio DMEM nuevo suplementado utilizando otra pipeta de 10 mL.

Estas células fueron mantenidas hasta la confluencia y se cosecharon para su posterior evaluación por citometría de flujo. Para esto se les retiró el medio, se lavaron con 2 mL de PBS, se añadieron 3 mL de tripsina y se incubó a 37°C por 3 a 5 minutos. Se observó a microscopio invertido para asegurarse de que las células se hubieran despegado, para lo cual se le dieron golpes suaves a la caja con la palma de la mano. Estas células fueron recuperadas y pasadas a un tubo cónico de 15 mL, donde se agregaron 3 mL de medio DMEM suplementado para inactivar la enzima. Posteriormente estas células fueron centrifugadas a 1,600 rpm/5 min y se les retiró el sobrenadante. Por último, se agregaron 800 μl

de PBS y se procedió con los pasos necesarios para la inmunofenotipificación, partiendo del reemplazo de PBS por PBS-BSA.

6.2 Procesamiento de las muestras de médula ósea

Las muestras de médula ósea fueron donadas por el servicio de Hematología del Centro contra el cáncer del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Estas constaban de muestras de 200 µl cada una, las cuales fueron resuspendidas en 20 mL de PBS + 1% de antibiótico y antimicótico, filtradas por un tamiz celular de 100 µm para eliminar aglomerados celulares y colectadas en tubos cónicos de 50 mL. Posteriormente fueron centrifugadas a 2,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Una vez realizado esto, se descarta el sobrenadante y se procedió a lavar las células 2 veces con PBS + 1% de antibiótico y antimicótico y posteriormente centrifugar a 650 rpm por 10 minutos. Después, la pastilla fue incubada con 3 mL de buffer de lisis de eritrocitos por 15 minutos para eliminar los glóbulos rojos de las muestras y se centrifugaron a 350 g por 5 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en medio F12 suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico y antimicótico y se filtraron por un tamiz celular de 40 µm para eliminar detritos celulares ocasionados por el buffer de lisis de eritrocitos.

6.3 Inmunofenotipificación celular

Las células de la SVF aisladas de las 7 muestras de tejido adiposo conservadas en 800 µl de PBS, así como las células de médula ósea obtenidas fueron sometidas a los siguientes pasos para su inmunofenotipificación.

Primero, se agregó 1 mL de buffer de lisis de eritrocitos a cada una de las muestras, se centrifugaron a 1000 rpm por 3 minutos, se retiró el PBS y se resuspendieron en PBS + BSA y se mezclaron por vórtex. (Para saber el volumen se tiene en cuenta el número de muestras que se van a

preparar; a cada tubo se le agregan 50 μ L de células). Después, se mezclaron por vórtex cada uno de los anticuerpos (Tabla 1) a utilizar y se añadieron 4 μ L de cada uno a los tubos correspondientes y 10 μ L de cada coctel. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de las células a cada tubo, se mezclaron por vórtex y se incubaron 30 minutos a oscuridad. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 300 g/10 minutos, se retiró el sobrenadante para eliminar anticuerpos no unidos y se lavó con 1mL de PBS + BSA al 0.5% y se mezcló por vórtex. Luego, se centrifugaron nuevamente, se retiró sobrenadante y se resuspendieron en 250 μ L de PBS + BSA al 0.5% y finalmente se agregaron 2 μ L de formalina para fijar las muestras. Estas muestras fueron leídas en un Citómetro de flujo BD Accuri™ C6(BD Biosciences). Los glóbulos rojos restantes en las muestras se excluyeron de acuerdo con los parámetros de sidescatter vs. forward scatter, obteniéndose 10,000 eventos para cada muestra. Los datos fueron analizados por el programa estadístico Prism 7.

Número de tubo	Anticuerpo(s)
1	Control sin teñir
2	CD90-APC
3	CD29-PE
4	CD326-PE
5	CD117-FITC
6	CD38-PE
7	CD45-PE
8	CD34-PE
9	CD24-PE
10	CD44-PE
11	Coctel 1: CD73-APC CD90-FITC CD105-PE
12	Controles de isotipo

Tabla 1. Plantilla de anticuerpos evaluados en ambos tipos celulares.

6.4 Análisis de expresión mediante RT-PCR

Para evaluar la expresión de factores angiogénicos producidos por las células recién aisladas de las muestras de médula ósea y SVF se llevaron a cabo los siguientes pasos.

Primero se diseñaron los primers correspondientes a los genes VEGFA, ANGPT1, CXCL8, TGF- β 1, PDGFA y PECAM1, así como el gen endógeno GAPDH (Tabla 2) y se mandaron sintetizar en IDT Technologies. Posteriormente se llevó a cabo la extracción del RNA total de las células de las muestras mencionadas anteriormente mediante el método del TRIzol. Para esto, se le añadió un 1 mL de TRIzol a la muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y posteriormente se añadieron 200 μ l de cloroformo, se homogenizó por vórtex y se centrifugó a 12,000g por 15 minutos a 4°C. Luego se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, se agregaron 0.5 μ l de isopropanol para precipitar el RNA y se dejó toda la noche a -80°C. Pasado este tiempo, se centrifugó por 10 minutos bajo las mismas condiciones anteriores, se removió el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75% para lavar el pellet y se mezcló por inmersión. Después se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 7,500g, se removió el sobrenadante y se dejó secar el tubo abierto a temperatura ambiente. Por último, el pellet de RNA se disolvió en la cantidad apropiada de agua de agua libre de RNAsas (20 μ l en cada ocasión) y se analizó la calidad y cantidad de este en el NanoDrop. Una vez ya extraído el RNA, se llevó a cabo la síntesis del cDNA utilizando el kit cDNA High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit con el programa de temperaturas mencionado en la tabla 3. Por último, se realizó la RT-PCR utilizando los primers diseñados y siguiendo el programa de temperaturas de la tabla 4. Por último, se observaron las bandas amplificadas en geles de agarosa al 2.5%, los cuales fueron corridos a 100 V por 60 minutos.

Gen	Secuencia de primers	Producto amplificado
VEGF	Forward: 5'GCAGAAGGAGGAGGGCAGAAT 3' Reverse: 5'GCACACAGGATGGCTTGAAGA 3'	148 nt
CXCL8	Forward: 5'GAAGTTTTTTGAAGAGGGCTGAGA 3' Reverse: 5'TGCTTGAAGTTTCACTGGCAT 3'	90 nt
ANGPT1	Forward: 5'AGCAACTGGAGCTGATGGAC 3' Reverse: 5'TCCTCCCTTTAGTAAACACCTTC 3'	77 nt
PDGFA	Forward: 5'AAGCAGCCAACCAGATGTGA 3' Reverse: 5'AGACCGCACACTGGCAATAA 3'	121 nt
TGFB1	Forward: 5'CGACTCGCCAGAGTGGTTAT 3' Reverse: 5'CCGGTAGTGAACCCGTTGAT 3'	156 nt
PECAM1	Forward: 5'AGACGTGCAGTACACGGAAGT 3' Reverse: 5'TGCTTTCCACGGCATCAGG 3'	122 nt
GAPDH	Forward: 5'ACAACAGCCTCAAGATCATCAGC 3' Reverse: 5'TCACGCCACAGTTTCCCGGAG 3'	172 nt

Tabla 2. Secuencia de los primers diseñados para el análisis de expresión de genes angiogénicos

	1	2	3	4
Temperatura	25°C	37°C	37°C	85°C
Tiempo	10 min	60 min	60 min	5 min

Tabla 3. Programa de temperaturas para la síntesis de cDNA

	1	2	3	4	5
Temperatura	95°C	94°C	60°C	72°C	72°C
Tiempo	3 min	30 s	45 s	50 s	10 min
	X35				

Tabla 4. Programa de temperaturas para las reacciones de PCR

6.5 Ensayo de angiogénesis *in vivo*

6.5.1 Construcción de andamios de fibroína

Para evaluar la formación de nuevos vasos sanguíneos en un modelo murino, se construyeron andamios de fibroína de 4 mm de ancho y 6 mm de diámetro que posteriormente fueron celularizados con las células a analizar. Para esto, se mezcló fibroína al 5% previamente liofilizada (AdvancedBioMatrix # 5154-20ML; 0.05 g/ml) con hexafluoroisopropol (HFIP) en una solución al 8% y se solubilizó en un

período de 1-3 horas a temperatura ambiente. Luego, agregamos esta mezcla a moldes cilíndricos de teflón de 2 cm de profundidad y 6 mm de diámetro con NaCl (tamaño de partícula de 77-177 μm) en la parte inferior (9:1 NaCl/fibroína) y se cubrieron con tapas de vidrio durante 10 minutos. Después de este tiempo, se agregó metanol hasta casi el tope del molde, colocamos las tapas nuevamente y lo dejamos reposar durante la noche. Las tapas se retiraron y los moldes se dejaron secar durante 3 días a temperatura ambiente y luego se sumergieron en metanol durante 1 h para que los andamios pudieran separarse de los moldes. Los andamios se colocaron en agitación en agua miliQ para desalarlos (1 L/andamio) durante 2 días (3 cambios de agua/día). Finalmente, los andamios se congelaron a -80°C durante 6 h, se liofilizaron 24h, se esterilizaron con óxido de etileno y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

6.5.2 Celularización del os andamios de fibroína

Para llevar a cabo la celularización de los andamios de fibroína construidos en la sección anterior, se utilizaron 6 ratas macho de la raza Wistar de 200g de peso y dos meses de edad aproximadamente, las cuales fueron sacrificadas mediante sobredosis de pentobarbital y se llevó a cabo la recolección de tejido adiposo y médula ósea de estas, elaborando un pool de tejido para cada tipo celular.

El aislamiento de la SVF fue llevado a cabo de la misma manera que en las muestras humanas, tal y como se indica en la sección correspondiente a esa parte de metodología, se contaron las células mediante el conteo en una cámara de Neubauer y fueron resuspendidas en medio DMEM suplementado con 10% de SBF y 1% de antibiótico y antimicótico para sembrar un total de 1×10^6 células por andamio en 30 μl de medio.

Respecto al aislamiento de médula ósea, este se llevó a cabo a partir de los fémures y tibias de las ratas, a los cuales se les cortaron las epífisis con un bisturí y con la ayuda de una jeringa con aguja se les hizo

pasar PBS por un extremo para la obtención de la médula ósea y a la solución resultante se le realizó el proceso de aislamiento reportado anteriormente para las muestras de humanos. Las células fueron contadas mediante la técnica de la cámara de Neubauer y se resuspendieron en medio DMEM suplementado con 10% de SBF y 1% de antibiótico y antimicótico para sembrar un total de 1×10^6 células por andamio en 30 μ l de medio.

La cámara de Neubauer es una cámara que se utiliza para contar células, la cual debe visualizarse a microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Esta cámara es parecida a un portaobjetos con una depresión en el centro en cuyo fondo se encuentra marcada una cuadrícula. En la figura 9 se muestra la cuadrícula de una cámara de Neubauer. Es un cuadro de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. El área sombreada marcada como "L" corresponde a 1 mm².

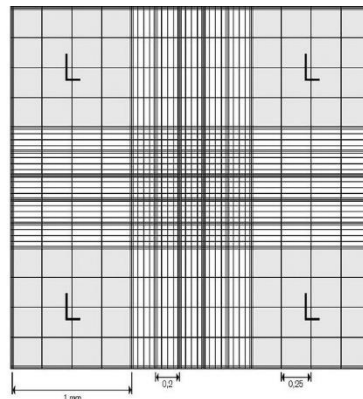


Figura 9. Cuadrícula de cámara Neubauer.

Se colocó la cámara de Neubauer con las células teñidas con azul tripano en el microscopio invertido a 10X utilizando el contraste de fases para distinguir las células. Se contó el número de células refringentes utilizando el patrón de la figura 10 para cada uno de los conteos.

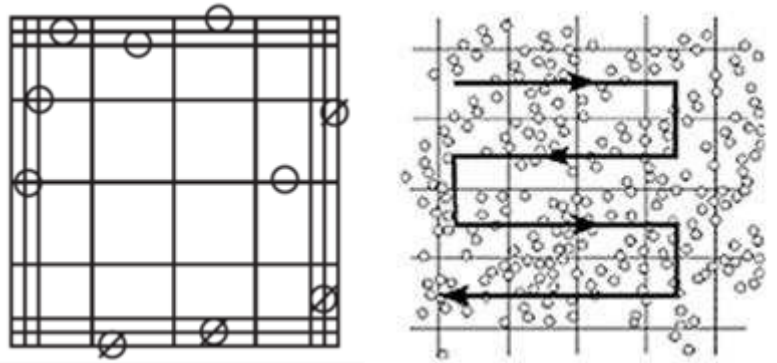


Figura 10. Conteo de células viables. En el esquema de la izquierda, las células que se encuentren dentro del límite marcado, superior e izquierdo son admisibles para el conteo celular. En el esquema de la derecha, el conteo se realizará de izquierda a derecha, y de arriba hacia abajo como se presenta en la imagen.

Para estimar el número de células viables/mL se prosiguió a realizar conteo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{\#de células viables por mL (células/mL)} = (\text{\#de células blancas}) \left(10,000 \times \frac{x}{4}\right) (\text{Factor de dilución})$$

Por último, los andamios fueron incubados en una placa de 24 pozos a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 2 horas antes de su implantación, esto para permitir la adhesión de las células al andamio.

6.5.3 Implantación de andamios celularizados

Para llevar a cabo la implantación de los andamios celularizados se utilizaron 3 ratas de la raza Wistar de 200 g de peso y dos meses de edad aproximadamente, las cuales fueron sedadas con una dosis de 8 mg/kg de xylacina y anestesiadas con una dosis de 20 mg/kg de zoletil (intramuscular). 3 andamios fueron implantados de manera subcutánea por rata: uno celularizado con las células de la SVF, otro con las células de la médula ósea y un control negativo sin células. La distribución de los andamios en el modelo de estudio se ejemplifica en la Figura 11.

Después de 10 días se removieron los andamios con un poco del tejido circundante, se fijaron en paraformaldehído al 4% + glutaraldehído

al 2.5% en PBS 1:1 y se almacenaron a temperatura ambiente por mínimo 3 horas y hasta la elaboración de cortes histológicos.

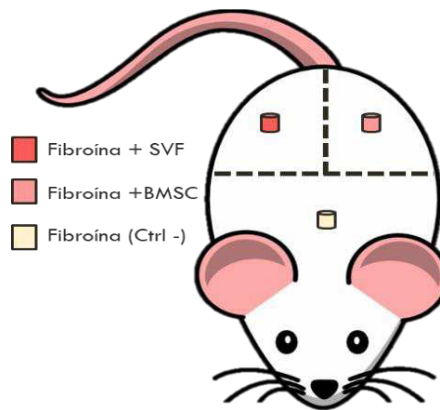


Figura 11. Distribución de los andamios implantados en el modelo de rata.

6.5.4 Análisis histológico

Para esto, las muestras previamente fijadas con paraformaldehído y glutaraldehído, se colocaron las muestras en casetes de inclusión y se deshidrataron en acetona graduales 70%, 90%, 90%, 100%, 100%, 20 minutos en cada una. Posteriormente se colocaron en las siguientes soluciones acetona/xilol, xilol 100%, xilol 100% cada una por 20 min. Después de esto, se colocaron en dos soluciones de parafina líquida por 30 min en cada una a 60°C. Luego, se colocaron las muestras en bloques de inclusión y embeber las muestras con parafina y se dejaron enfriar los bloques para después desmontarlos y hacer los cortes en microtomo.

Para poder realizar las tinciones de las laminillas con los cortes, estas se colocaron en un horno a 60°C por 15 minutos para desparafinar, posteriormente se colocaron en xilol 5 minutos, etanol/xilol 5 minutos, etanol absoluto 2 minutos, alcohol de 96° por 2 minutos y enjuagar lentamente en agua destilada. Proceder a realizar las tinciones de Hematoxilina & eosina y Tricrómico de Masson.

Para realizar la tinción de H&E, se colocaron las laminillas correspondientes en solución de hematoxilina por 2 minutos y se

realizaron dos lavados con agua de la llave lentamente. Posteriormente, se realizó una inmersión rápida en alcohol ácido, se lavaron dos veces con agua de la llave lentamente y luego con agua destilada. Después se realizaron dos inmersiones rápidas en agua amoniaca y un enjuague lento con agua de la llave y agua destilada. Después de esto, se hicieron 6 inmersiones rápidas en eosina para luego deshidratar en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 segundos cada uno. Finalmente, se realizó el aclaramiento en 2 cambios de xilol de 15 segundos cada uno y se montaron con resina.

Para realizar las tinciones con Tricrómico de Masson, se colocaron las laminillas en solución de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, se lavaron con agua de la llave hasta que pierda el color amarillo y se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente, se tiñeron los núcleos con hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos y se lavaron con agua de la llave por 5 minutos. Luego, se enjuagaron con agua destilada hasta que deje de salir el color de la hematoxilina. Después se tiñeron las laminillas en solución de fucsina-escarlata por 5 segundos (el tiempo depende de la muestra) y se lavaron en agua destilada hasta dejar de teñirse. Posteriormente se colocaron solución de ácidos fosfotúngstico-fosfomolibdico por 10 minutos, se enjuagaron brevemente en agua destilada y se tiñeron con azul de anilina por 15 segundos (el tiempo depende de la muestra) y se lavaron con agua destilada hasta que deje de teñirse. Posteriormente se hicieron una inmersión de 15 segundos en ácido acético acuso al 1% y, por último, se deshidrataron en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 segundos cada uno, se aclararon en 2 cambios de xilol de 15 segundos cada uno y se montaron con resina.

Se tomaron micrografías de estos cortes y se llevó a cabo el conteo de los vasos sanguíneos presentes en los cortes teñidos con Tricrómico de Masson, donde se contaron 6 campos aleatorios y se promedió la cantidad de vasos sanguíneos presentes en estos, esto por triplicado para cada uno de los tratamientos analizados.

6. 6 Ensayo de formación de tubos capilares.

Para demostrar la formación de la red capilar in vitro, se utilizó el kit Cultrex® in vitro Angiogenesis Assay 96 well (Trevigen, Gaithersburg, MD, Núm. Cat 3470-096-K). En este ensayo se comparó el potencial angiogénico de las células de la SVF (n=1) y de las células troncales de la médula ósea (n=1).

Para esto, primero se descongeló la solución de RGF BME de Cultrex en un baño de hielo en el refrigerador a una temperatura de 2-4°C toda la noche. El día del ensayo, se añadieron 50 µl/por pocillo de la solución de BME en una placa de 96 pozos en la campana de flujo laminar y trabajando en hielo (3 pozos por cada muestra). Se comprobó que el BME estuviera bien distribuido en cada pozo y se centrifugó la placa a 250 g/5 min a 4°C y posteriormente se incubó a 37°C de 30 min a 1 h para que gelificara.

Las células tanto de la SVF como de la médula ósea fueron aisladas siguiendo la metodología descrita anteriormente y resuspendidas en medio DMEM sin suplementar y adicionado con VEGF a una concentración de 50 ng/mL. Cada una de estas células fueron contadas mediante la técnica de cámara de Neubauer para sembrar 15,000 células por pocillo.

Después de la siembra de las células se llevó la placa a incubación a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂, donde permanecieron las células por un periodo de 10 días, renovando la concentración de VEGF cada 3er día. La placa fue revisada cada día para observar cambios en la apariencia y disposición de las células. Después de este tiempo se tomaron fotografías en microscopio invertido.

6.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo en el programa estadístico Prism 7, realizando ANOVAs de dos y una vía, donde se

aplicaron las pruebas estadísticas de Sidak para comparaciones múltiples, así como la prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Dunnett y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos fueron considerados significativos con una * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

7. RESULTADOS

7.1 Adaptación del aislamiento de la Fracción Vascular Estromal de tejido adiposo para su aplicación clínica

Siguiendo el protocolo propuesto por Raposio y cols. publicado en el 2017 y bajo ciertas modificaciones que realizamos para adecuar el proceso a la aplicación en pacientes, fue posible definir un procedimiento para el aislamiento de la Fracción Vascular Estromal derivada de tejido adiposo humano y su posterior aplicación en pacientes. Cabe resaltar que este procedimiento contempla el uso de la colagenasa grado GMP NB6, la cual consiste en una mezcla de colagenasas recombinantes 1 y 2, producida en la bacteria *Clostridium histolyticum*.

Bajo este procedimiento se aisló de forma reproducible, a una población celular que co-expresaba el triple marcador CD73/CD105/CD90, y el aislamiento de esta población general fue independiente de la concentración de colagenasa utilizada (Figura 10). De manera interesante, tal como se muestra en la figura 10; la expresión de los marcadores CD90, CD44 y CD29 nos permitieron identificar diferentes subpoblaciones definidas dependiendo del porcentaje de colagenasa utilizada en el aislamiento. La concentración de colagenasa de 0.2%, determina el aislamiento de una subpoblación que es claramente positiva para los marcadores CD29 (93.5%) y CD90 (75.9%) cuya expresión es mayor cuando se compara con la subpoblación aislada con 0.1% ($p < 0.0001$).

Tras el análisis de los marcadores hematopoyéticos, observamos un alto porcentaje de células CD34+, cuyo porcentaje de expresión fue independiente de la concentración de enzima utilizada. Este resultado es importante ya que determina dentro de la matriz celular de la SVF, la presencia de células de linaje hematopoyético que son clave en el apoyo de un proceso de angiogénesis sostenido. Con respecto a los marcadores CD117 y CD38, bajo ambas condiciones la expresión resultó negativa. En relación con el antígeno CD45, aun cuando la diferencia entre ambas

condiciones fue estadísticamente significativa en ambas condiciones se considera negativa.

Finalmente, los marcadores epiteliales CD24 y CD326 fueron negativos sin mostrar dependencia respecto a la concentración de NB6 utilizada en el aislamiento.

Con base en estos resultados se seleccionó la concentración de 0.2% como la más adecuada para seguir utilizando en los futuros experimentos.

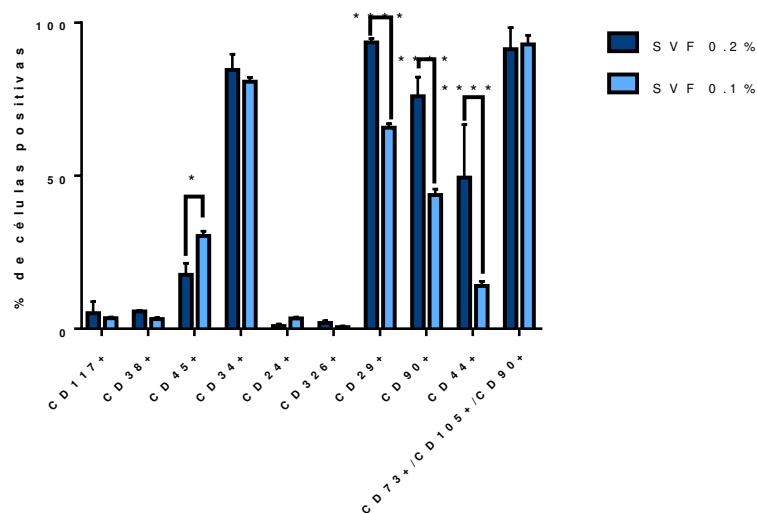


Figura 12. Expresión de antígenos de superficie presentes en células aisladas con colagenasa NB6 a 0.2 y 0.1%. Se observan diferencias significativas en el porcentaje de expresión de los marcadores de superficie celular CD45 (marcador hematopoyético), CD29, CD90 y CD44 (marcadores mesenquimales). (Prueba de Sidak para comparaciones múltiples, *P = 0.0251, **P = <0.0001).**

Para corroborar la presencia de células troncales mesenquimales en la Fracción Vascular Estromal que fue aislada con la metodología adaptada en este estudio, se llevó una muestra de estas células a cultivo celular y se analizó la morfología de las células presentes en ella. En el cultivo primario, las células visualizadas en microscopio invertido mostraban una morfología de tipo fibroblastoide y alargada, tal como se observa en la figura 13. En la figura 13a se observó la presencia de abundantes eritrocitos, y células no adherentes de morfología redondeada. Estas células fueron eliminadas en los cambios de medio de

cultivo posteriores hasta llegar a una confluencia del 80% al cabo de 14 días (Figura 14).

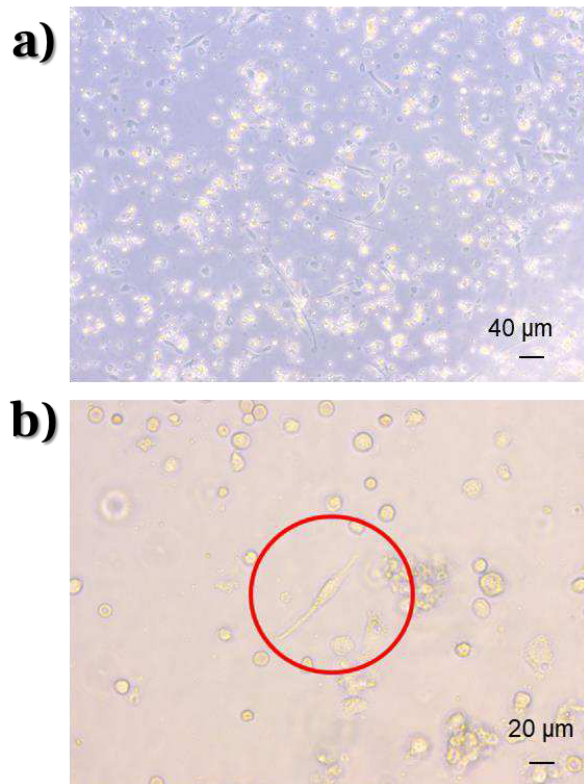


Figura 13. Imágenes representativas del cultivo primario de la Fracción Vascular Estromal (SVF). En el inciso a) (10x) puede apreciarse la alta cantidad de células no adherentes y eritrocitos, además de las células troncales mesenquimales con su morfología fibroblastoide característica. En el inciso b) (20x) observamos una ampliación a una célula troncal mesenquimal donde se aprecian mejor sus características morfológicas

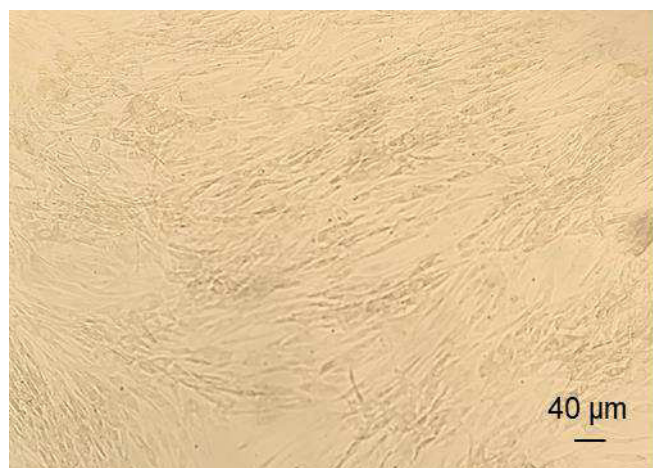


Figura 14. Cultivo primario de SVF a confluencia del 80%. células troncales mesenquimales adherentes de morfología fibroblastoide clásica. La confluencia mostrada se alcanzó luego de 14 días de cultivo.

Sin embargo, como las características morfológicas y de adherencia al plástico no son suficientes para comprobar la identidad de las células presentes en el cultivo como Células Troncales Mesenquimales, también se analizaron una serie de marcadores de superficie celular mediante citometría de flujo. En la gráfica de la figura 15 podemos observar que las células presentes en el cultivo sólo expresan los marcadores mesenquimales CD29 y el triple marcaje con CD73, CD105 Y CD90, mientras los marcadores hematopoyéticos y epiteliales son negativos, lo cual indica claramente la presencia de únicamente Células Troncales Mesenquimales.

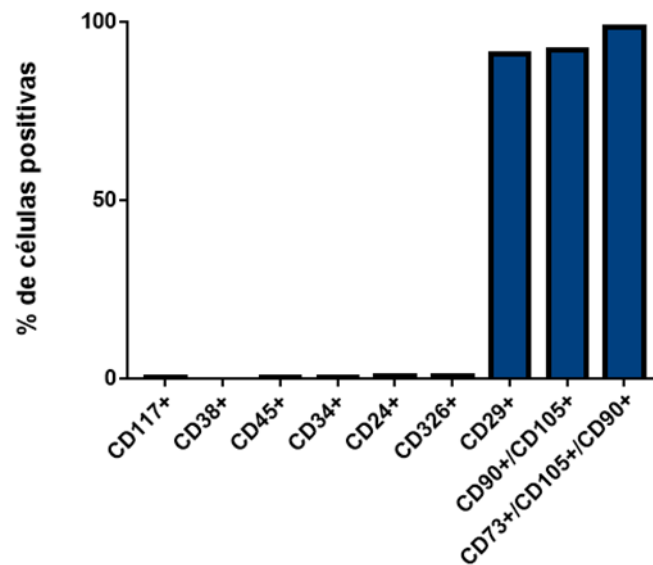


Figura 15. Comparación de marcadores presentes en la SVF en cultivo celular. Luego de que la SVF es cultivada durante 14 días, solamente se conserva la expresión de los antígenos de superficie del linaje mesenquimal.

7.2 Comparación del inmunofenotipo y del perfil de expresión de factores angiogénicos de las células de la SVF vs el de las de médula ósea

Para comenzar a evaluar el potencial angiogénico de ambas matrices celulares, se partió de la comparación del inmunofenotipo de las células presentes en cada una de ellas. Mediante citometría de flujo se comparó la expresión de antígenos de superficie que no solo permiten identificar células de los linajes mesenquimal (CD73, CD105, CD90, CD29 y CD44), hematopoyético (CD117, CD38, CD45 y CD34) y epitelial (CD24

y CD326); si no que además poseen una función que recae en la promoción de un proceso angiogénico como lo es la co-expresión de los antígenos CD105 (mesenquimal) y CD34 (hematopoyético) (Figura 16).

La población general positiva para el triple marcaje CD73/CD105/CD90, fue claramente positiva (91.3%) en las células de la SVF, mientras que en médula ósea, a pesar de ser positiva, el porcentaje de frecuencia fue de tan solo 37.4%.

El análisis de FACS para los marcadores hematopoyéticos mostró una expresión negativa para los antígenos CD117 y CD38 tanto en la SVF como en las células de la médula ósea. En contraste el marcador CD34 fue positivo en ambas muestras (84.5% y 82.1% respectivamente). Cabe resaltar que para las células de la médula ósea es un resultado esperado, no así para la SVF; demostrando la heterogeneidad de la SVF y el potencial angiogénico comparable al de la MO.

Se confirmó la alta expresión del marcador CD45 en la MO y la ausencia de este en las células presentes en la SVF; lo que constituye un resultado esperado.

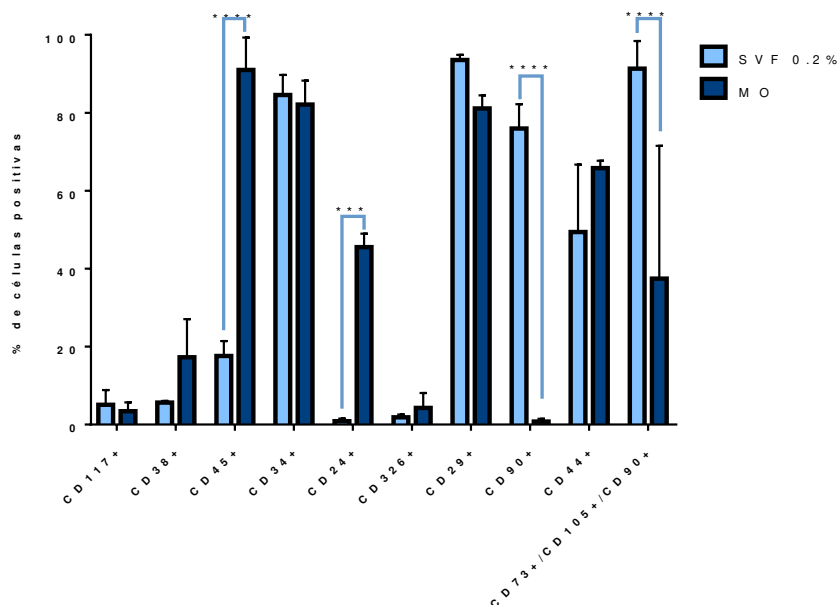


Figura 16. Comparación de marcadores presentes en la SVF vs los presentes en médula ósea. Mediante citometría de flujo se observaron diferencias significativas en los marcadores CD45, CD24, CD90 y el triple marcaje con CD73/CD105/CD90, indicando una mayor cantidad de células mesenquimales en las muestras de SVF (Prueba de Sidak para comparaciones múltiples, *** $P = 0.0003$, **** $P = <0.0001$).

Ya que conocimos las características de la superficie de las células presentes en ambas muestras; se realizó el análisis semicuantitativo de la expresión de los factores relacionados con la angiogénesis: PECAM1, TGF- β 1, CXCL8, y ANGPT1. La expresión fue normalizada contra la expresión del gen endógeno GAPDH.

Los resultados mostraron la expresión positiva para todos los marcadores analizados en las células presentes en la MO recién aislada (Figura 17). Aunque todos fueron positivos, ANGPT1 muestra la expresión más baja, sin embargo, esto es de esperarse ya que este factor es un marcador de la red primitiva endotelial. Esto nos habla de un perfil de expresión que favorece la angiogénesis

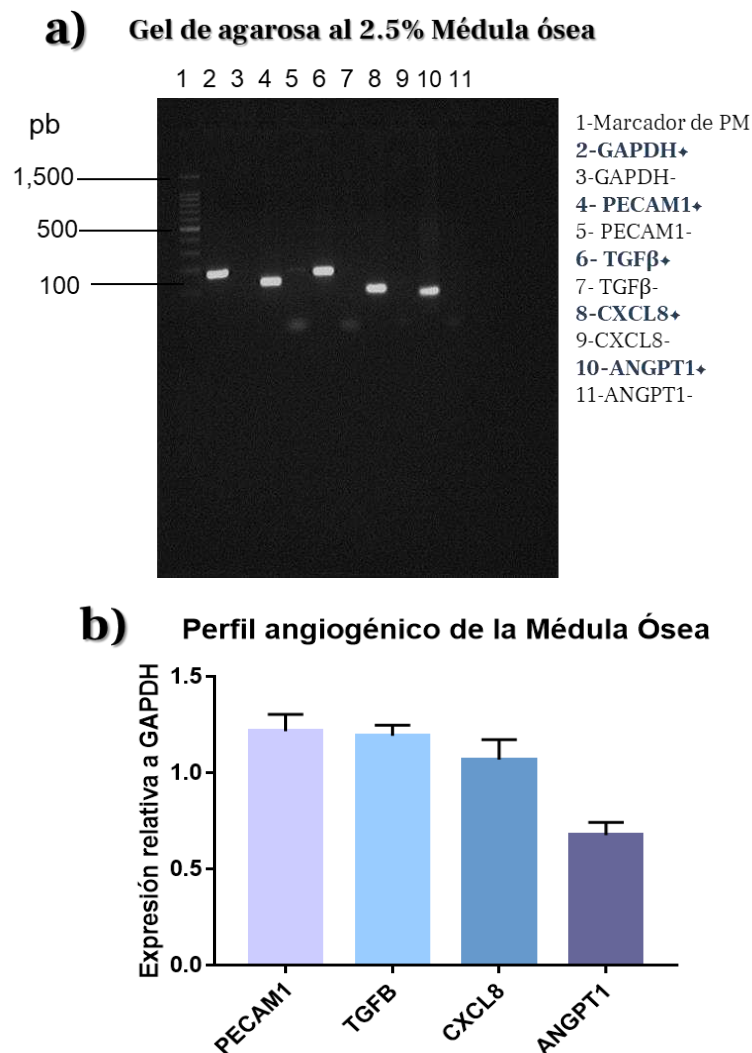
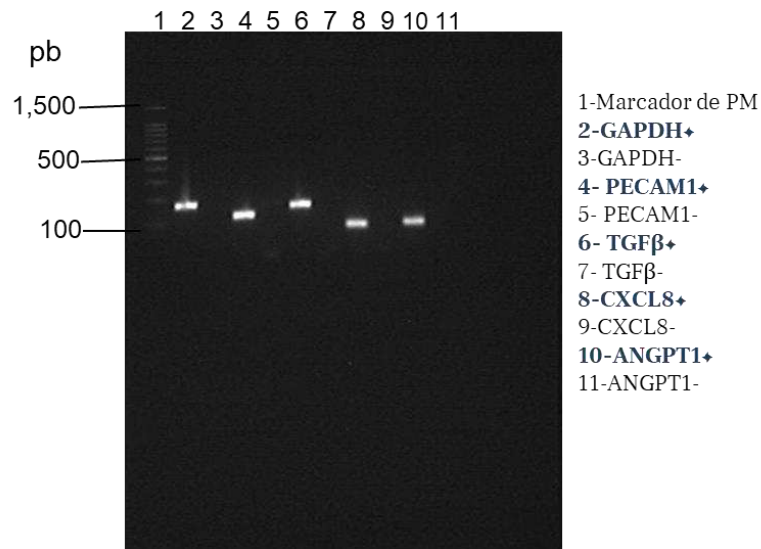


Figura 17. Perfil de expresión angiogénico de las células de la médula ósea. a) Gel representativo de la amplificación de los transcritos de los factores PECAM 1, TGF- β 1 y CXCL8 en médula ósea, así como del gen endógeno GAPDH utilizado como gen normalizador. b) Se evaluaron los datos de tres experimentos independientes y se grafica la media \pm desviación estándar.

Por otro lado, en la figura 18 se muestra el perfil angiogénico de las células contenidas en la SVF, en donde se puede apreciar que el perfil es similar al observado en la MO. Esto nos indica que ambas matrices celulares cuentan a nivel transcripcional, con el mismo potencial para la generación de vasos sanguíneos (Figura 19).

a) Gel de agarosa al 2.5% Fracción Vascular Estromal



b) Perfil angiogénico de la Fracción Vascular Estromal

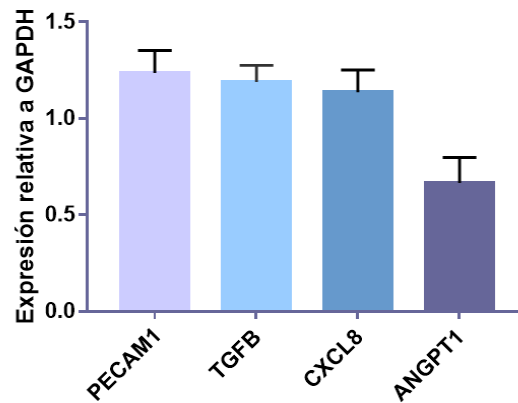


Figura 18. Perfil de expresión angiogénico de las células de la SVF. a) Gel representativo de la amplificación de los transcritos de los factores PECAM 1, TGF- β 1 y CXCL8 en médula ósea, así como del gen endógeno GAPDH utilizado como gen normalizador. b) Se evaluaron los datos de tres experimentos independientes y se grafica la media \pm desviación estándar.

Comparación de potencial angiogénico de Médula Ósea y SVF

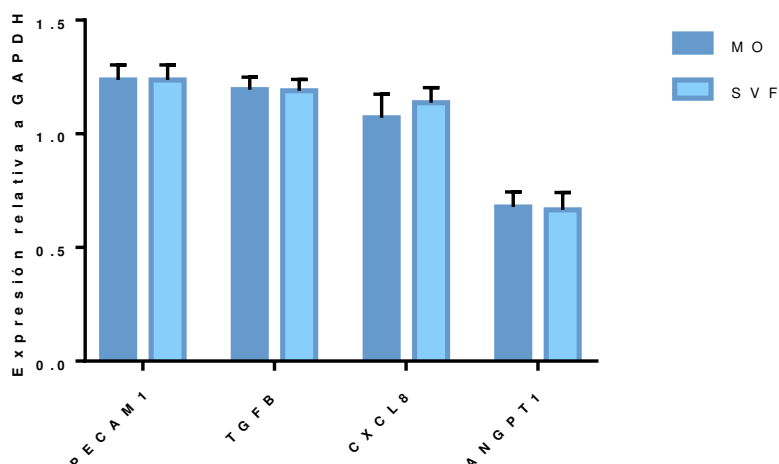


Figura 19. Comparación del potencial angiogénico entre las células de la médula ósea y la SVF. No se encuentran diferencias significativas entre los perfiles de expresión de ningún marcador de las 2 matrices celulares analizadas. (Prueba de Sidak para comparaciones múltiples).

7.3 Comparación de la formación de vasos sanguíneos en un modelo murino de implantación subcutánea de las células de la SVF vs. células de la médula ósea.

Si bien a nivel transcripcional no se observaron diferencias significativas en la expresión de genes relacionados con la angiogénesis entre la MO y la SVF; el siguiente paso fue evaluar si eran capaces de inducir angiogénesis en un modelo in vivo, cuando éstas son expuestas a un microambiente propicio para este proceso. Se seleccionó el modelo de implante subcutáneo en la espalda de rata en donde las células fueron colocadas en el sitio de la lesión utilizando como soporte un andamio de fibroína de seda. Luego de 10 días las piezas histológicas fueron recuperadas para su análisis.

Mediante la observación macroscópica de la zona de la lesión, se podía apreciar al implante encapsulado y vasos sanguíneos de pequeño calibre en la zona que circunscribe al implante; esta observación fue evidente para los implantes que contenían a las células de la MO y de la SVF no así para el control sin células (Figura 20).

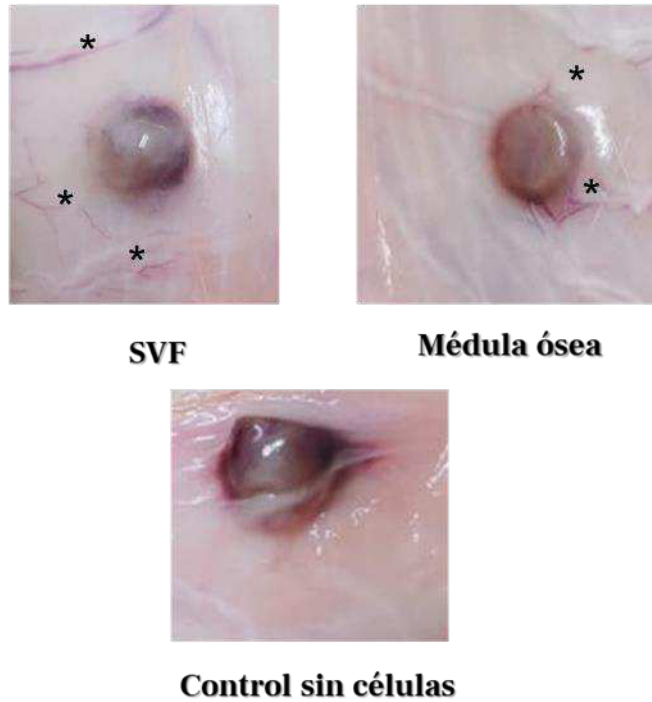


Figura 20. Observación macroscópica de los andamios implantados después de 10 días. Se observa la formación de una cápsula que recubre el andamio y la formación de redcillas vasculares (asteriscos negros)

Los efectos de la implantación de las células sobre la generación de vasos sanguíneos se evaluaron con histología local luego de 10 días, y posterior tinción con H&E para observar la morfología y celularidad, y con Tricrómico de Masson para evaluar la matriz extracelular. Los resultados se muestran en la Figura 21 a 23.

La figura 21, corresponde al control sin celularizar, en donde se puede observar la formación de una cápsula que rodea al andamio (señalada con una flecha); esta cápsula es fibrosa. Por otro lado, mediante la tinción de Tricrómico de Masson se confirma que la cápsula formada está compuesta de colágena al teñirse de azul, identificando a los fibroblastos como los responsables de la secreción de esta.

En el aumento de 40x se puede observar los restos de la fibroína, la cual forma una entramado o enrejado (flecha negra sobre la tinción de H&E). También se pueden apreciar escasos eritrocitos extravasados. En la tinción de Tricrómico de Masson se aprecian islotes de colágena dentro del andamio implantado, de color azul. En el aumento de 40x se puede

observar más de cerca las células que ocupan las cavidades que forma la fibroína, la cual forma una entramado o enrejado, también señalado con una flecha en la imagen. También se pueden apreciar eritrocitos extravasados, aunque no son muy abundantes. En el Tricrómico de Masson de este aumento podemos observar que hay islotes de colágena dentro del andamio implantado, de color azul, lo cual representa un buen ambiente para el desarrollo de vasos sanguíneos, ya que el colágeno provee de soporte y permite una buena interacción con las células.

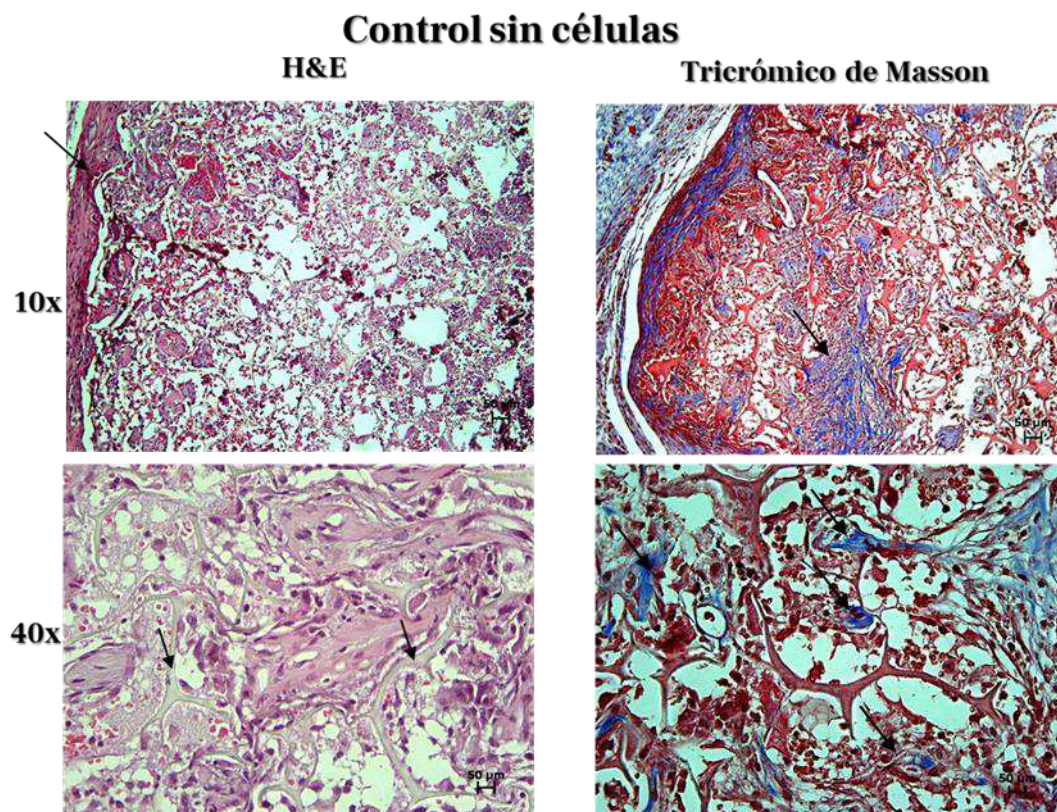


Figura 21. Tinciones de H&E y Tricrómico de Masson de los cortes de los andamios sin células. Se señala en el H&E del aumento de 10x la cápsula fibrosa formada alrededor de los andamios, la cual se comprueba que es de composición colagenosa en el Tricrómico de Masson del mismo aumento. En el aumento de 40x de H&E se señala con una flecha el entramado que forma la fibroína, mientras que en el de Tricrómico de Masson se observa un infiltrado de colágena dentro del andamio.

En la figura 22, se muestra el efecto de las células de la médula ósea implantadas sobre el andamio de fibroína, en donde la presencia de una reacción inflamatoria es evidente. Al analizar la presencia de vasos sanguíneos, se encontró una mayor presencia de vasos sanguíneos en estas muestras en comparación con las del control, los cuales están

señalados con flechas rojas en los aumentos de 40x y presentaban un calibre variable.

Médula ósea

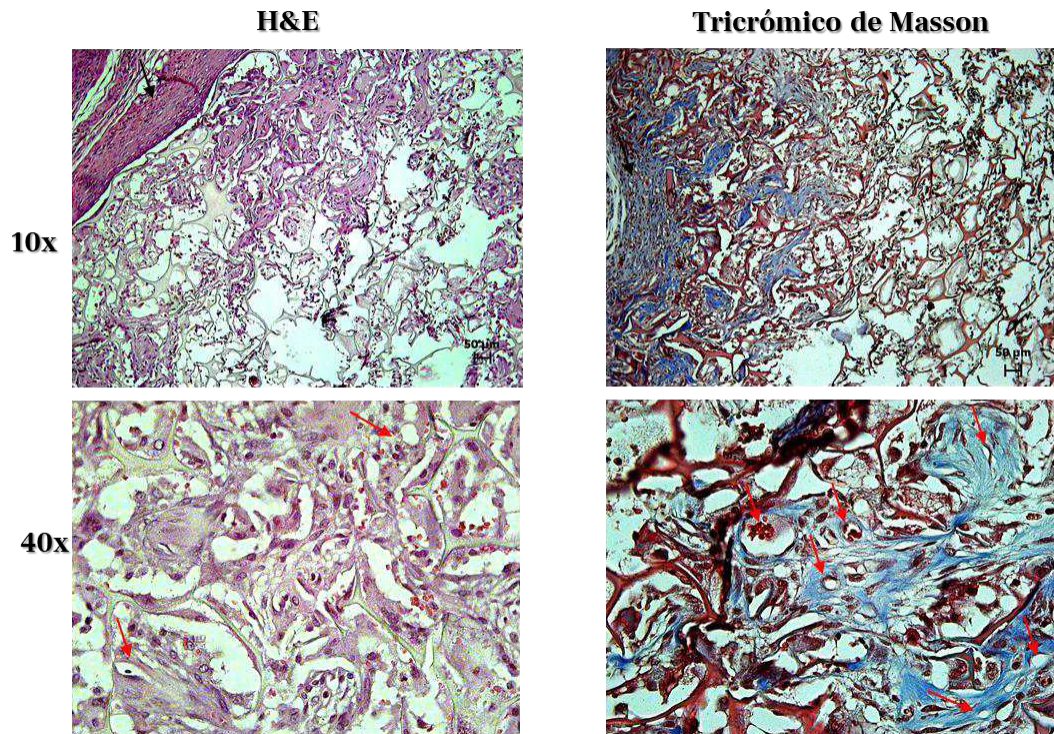


Figura 22. Tinciones de H&E y Tricrómico de Masson de los cortes de los andamios celularizados con células de la Médula Ósea. Se señala en el H&E del aumento de 10x la cápsula fibrosa formada alrededor de los andamios, la cual se comprueba que es de composición colagenosa en el Tricrómico de Masson del mismo aumento. En el aumento de 40x de H&E se señala con flechas rojas los vasos sanguíneos presentes en la imagen, los cuales son más numerosos en la tinción del Tricrómico de Masson, así como de calibre variable

Al analizar la capacidad de las células de la SVF para inducir la angiogénesis, observamos como hallazgo importante un proceso inflamatorio más intenso en comparación con el grupo de la MO. En relación con la formación de capilares sanguíneos, se aprecia que estos eran menos abundantes y de menor que en el grupo de la médula ósea (Figura 23).

Fracción Vascular Estromal

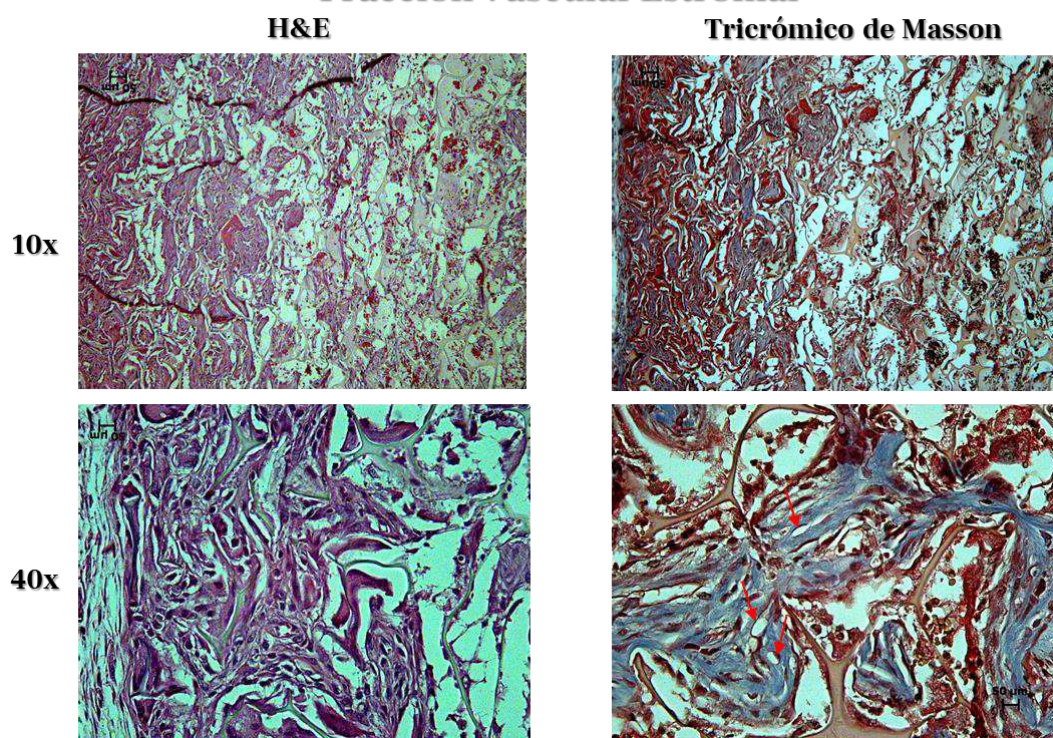


Figura 23. Tinciones de H&E y Tricrómico de Masson de los cortes de los andamios celularizados con células de la SVF. Se repite lo encontrado en las muestras anteriores, recalcando que el proceso inflamatorio es mayor en estos andamios. En el aumento de 40x de Tricrómico de Masson se señalan con flechas rojas algunos capilares encontrados en la micrografía presentada.

Para realizar la cuantificación histomorfométrica, se llevó a cabo el conteo de los vasos sanguíneos en el aumento 40x; se tomaron 6 campos aleatorios de cada una de las 3 repeticiones y se calculó un promedio por cada una de ellas, el cual se graficó. Los resultados se muestran en la Figura 24, donde podemos observar que bajo estas condiciones de experimentación las células provenientes de la médula ósea generan un mayor número de vasos sanguíneos en comparación con las células provenientes de la SVF. Este conteo no considera ni el calibre de los vasos sanguíneos, ni tampoco si éstos son mantenidos a largo plazo.

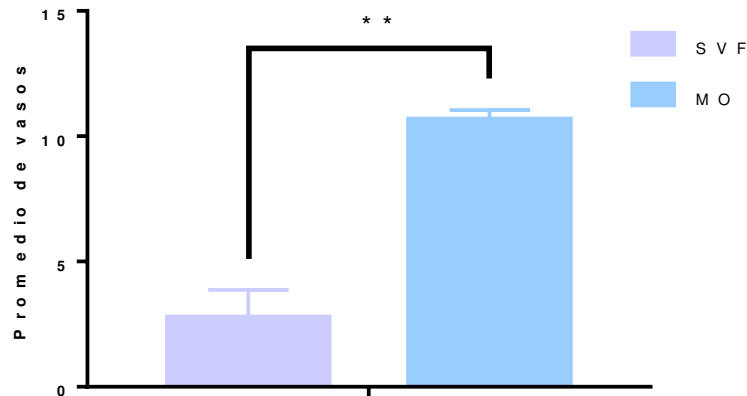


Figura 24. Comparación de la cantidad de vasos sanguíneos presentes en los andamios celularizados con células de la médula ósea y de la SVF. Existe diferencia significativa entre la cantidad de células presentes en estos andamios, siendo más abundantes en los andamios que contenían células de la médula ósea. (Prueba de Tukey para comparación de muestras múltiples **P= 0.0012).

Tomados en conjunto los resultados anteriores se puede concluir que la MO presenta un mejor potencial angiogénico, sin embargo, debido a que una de las limitantes en el diseño experimental del modelo implantación subcutáneo es que no contempla la influencia de los elementos solubles presentes en la SVF; a continuación se realizó un ensayo de angiogénesis *in vitro*, sobre Matrigel.

Las células cultivadas a tiempos cortos en ausencia de matriz extracelular alguna, forman monocapas; mientras que la SVF cultivada sobre Matrigel experimenta un cambio fenotípico que se asemeja a la vasculogénesis y la angiogénesis después de 10 días (Figura 25). Las células contenidas en la SVF sembradas en Matrigel comienzan a migrar y forman grupos que varían en tamaño y número de células. El siguiente fenómeno ocurre cuando las células de punta posteriormente migran fuera del grupo. Durante la angiogénesis, las células endoteliales emergen de un vaso preexistente y remodelan la matriz extracelular circundante a través de la secreción de metaloproteasas de la matriz. En última instancia, estas células de punta migran lejos del vaso naciente junto con células endoteliales adicionales creando vasos colaterales que formarán lúmenes con el tiempo. De hecho, después de la migración de las células de punta, vemos el desarrollo de células de tallo de mayor calibre. En contraste, el comportamiento de las células de la MO en donde

luego de 10 días en cultivo bajo el estímulo de VEGF no mostraron cambios morfológicos ni de organización o migración que reflejaran la formación de vasos sanguíneos.

Estos datos nos demuestran la dependencia de los factores solubles contenidos en la SVF para el adecuado desarrollo de los vasos sanguíneos, por lo que al ser esta fracción utilizada en términos de promoción de la angiogénesis, ésta deberá ser colocada completa.

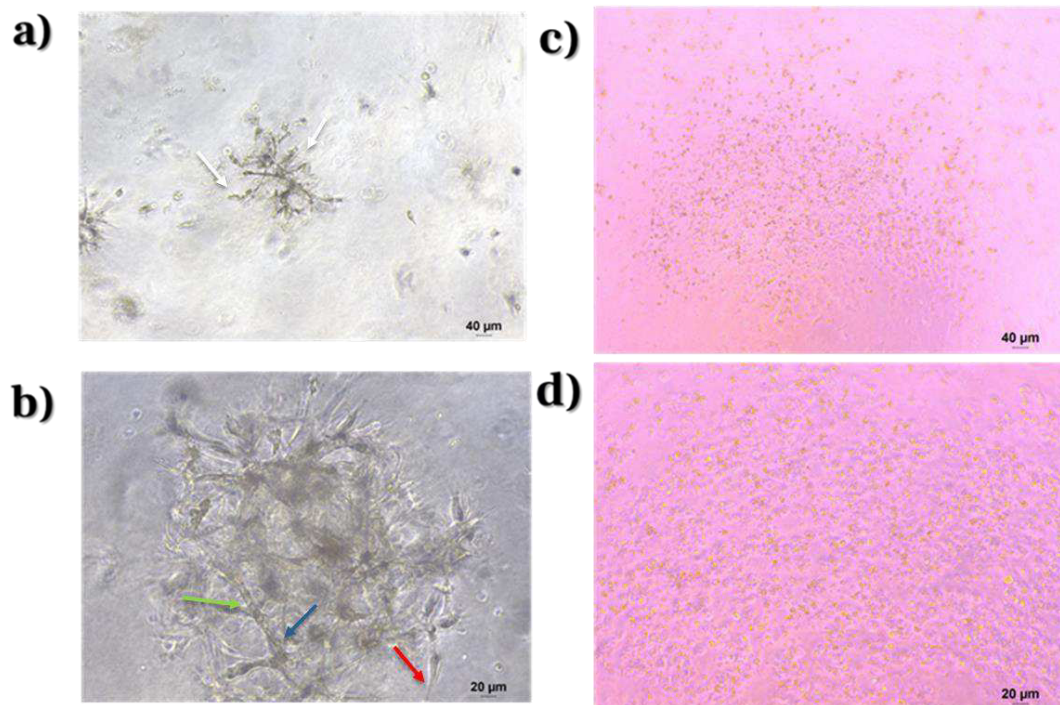


Figura 25. Imágenes de la SVF y de la MO en el sistema Cultrex a los 10 días. La imagen en b), corresponde a un zoom óptico de la sección mostrada en a). Las flechas blancas demuestran el agrupamiento celular inicial. La formación de células en la punta es marcada por la flecha roja. La formación y el alargamiento de las células del tallo se señalan con la flecha azul. La flecha verde señala las ramificaciones. En los incisos c) y d) se observan las células de la MO, donde es evidente la ausencia de estructuras parecidas a vasos sanguíneos.

8. DISCUSIÓN

La hipótesis de este trabajo fue que el potencial angiogénico de las células troncales de la Fracción Vascular Estromal era mejor en comparación con las de la médula ósea. Esta hipótesis finalmente no se cumplió debido a que el experimento de implantación de ambas matrices celulares en un modelo murino mostró lo contrario, siendo los andamios celularizados con las células de la MO los que generaban una cantidad mayor de vasos sanguíneos en comparación con los celularizados con las células de la SVF. La limitante de este ensayo es que no se permite que los factores que secretan las células cumplan su función del todo, ya que el andamio sólo permite la adhesión de las células, pero no de los factores secretados por ellas en las 2 horas que estos son incubados antes de ser implantados. Por esto es necesaria la realización de un experimento que permita la acción de estos factores secretados.

La primera comparación que se llevó a cabo en este estudio fue la del inmunofenotipo de la población celular aislada con distintas concentraciones de la colagenasa de grado GMP, NB6. Esto se realizó debido a que se quería seleccionar la concentración de esta enzima que nos permitiera aislar una población celular más rica en células que expresaran marcadores mesenquimales en su superficie. Nuestros resultados arrojaron diferencias significativas en la expresión de los marcadores estudiados de manera dependiente de la concentración, las cuales fueron de 0.1 y 0.2%. Los marcadores hematopoyético más sensibles a este aspecto fueron el CD45 y los marcadores mesenquimales CD29, CD90 y CD44. Si bien el triple marcaje con CD90, CD105 y CD73 no mostró diferencias significativas, se decidió utilizar la concentración de 0.2%.

Existen algunas fuentes que aseveran que cuando se utiliza el método enzimático para la obtención de la Fracción Vascular Estromal existen diversos pasos críticos a considerar. Algunos de estos son: tipo de enzima utilizada, el tiempo de digestión, la concentración de la enzima, si se va a utilizar un buffer de lisis de eritrocitos, si se van a llevar a cabo

pasos de filtración, entre otros. Esto puede influir sobre el tipo de población celular aislada en términos de inmunofenotipo, así como el rendimiento celular total obtenido (Riis et al., 2015).

Un ejemplo de esto es un estudio en el cual se comparan 4 métodos automatizados, los cuales utilizan diferentes metodologías para la obtención de la SVF. Entre los métodos descritos, MultiStation hace uso de la colagenasa NB6 (SERVA) utilizada en nuestro estudio. Los autores reportan diferencias significativas en muchos de los parámetros analizados, como el número total de células nucleadas por mL obtenidas por cada dispositivo, la viabilidad de estas y la actividad de colagenasa residual por mL en las muestras después del proceso enzimático. En cuanto al número de células nucleadas por mL de muestra, el dispositivo que utilizaba la colagenasa NB6 ocupó el segundo lugar de mayor rendimiento, mientras que fue el que presentó una mayor viabilidad celular, así como una actividad menor de colagenasa residual. Sin embargo, ellos no reportan diferencias significativas en cuanto al inmunofenotipo de las células aisladas por las diferentes metodologías, siendo la de mayor frecuencia (%) la que posee el perfil CD31-/CD34+/CD45- (Aronowitz, Lockhart, Hakakian, & Birnbaum, 2016). Este estudio centra su análisis en el análisis de los antígenos propio del linaje hematopoyético, sin embargo, la presencia de las células de linaje mesenquimal no es considerada. Estos autores no concluyen si algún dispositivo es mejor que otro, sino que aseveran que cada médico o personal de la salud que vaya a utilizar la SVF debe de decidir cuál es el acercamiento que más le conviene utilizar para su aplicación específica.

Otro estudio donde se demuestra que el aislamiento de la SVF se ve afectada por la metodología utilizada es el publicado en el 2017 por Rogríguez y colaboradores, donde se compara la eficiencia entre 3 dispositivos automatizados, así como un método manual de referencia. En este estudio 2 de los 3 dispositivos analizados, al igual que el método de referencia, utilizan la enzima Colagenasa NB6 (SERVA). Ellos encuentran diferencias significativas en el porcentaje de células que expresan CD90, siendo el método de referencia el que presentaba una mejor eficiencia. En

este valioso estudio, analizan marcadores mesenquimales, tales como CD73, CD34 y CD45, en donde observamos concordancia con los descritos en nuestro estudio (>75%,>50%,>60%y >25%, respectivamente). Cabe resaltar que no se reporta, la expresión para el marcador CD105 cuya participación en términos de angiogénesis es clave. De la misma forma ellos analizaron los marcadores presentes en cultivo celular después del primer pasaje, donde, al igual que nosotros, sólo encontraron marcadores mesenquimales presentes en estas células (Rodriguez et al., 2017).

En cuanto a la citometría de flujo de la Fracción Vascular Estromal aislada bajo la concentración seleccionada de 0.2% de colagenasa NB6 en nuestro protocolo adaptado, tenemos que los resultados encontrados coinciden con los porcentajes informados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) para células aisladas de tejido adiposo. Estos criterios indican que los marcadores mesenquimales CD29, CD44, CD90 y CD73 deben ser superiores al 40%, mientras que el marcador hematopoyético CD45 se encuentra presente generalmente por debajo del 50%, lo que concuerda con lo observado en este trabajo (Bourin et al., 2013). Asimismo, esta sociedad también declara que las Células Troncales Mesenquimales derivadas de tejido adiposo que hayan sido aisladas mediante el cultivo de la SVF deben ser positivas para los marcadores mesenquimales CD73 y CD90, mientras que deben ser negativas (<2%) para los marcadores hematopoyéticos CD45, y en el caso del CD34, este debe ir disminuyendo conforme se dan las divisiones celulares, así que no sería extraño encontrarlo expresado en las primeras fases del cultivo celular.

Cuando se realizó la comparación del inmunofenotipo de las células de la SVF contra las de las células de la médula ósea, se encontraron diferencias significativas en ciertos marcadores, más específicamente en el marcador hematopoyético CD45, en los mesenquimales que incluyen el CD90 y el triple marcaje con CD73/CD105/CD90, así como en el marcador epitelial CD24. Respecto a los marcadores hematopoyéticos y epiteliales, la ISCT también reporta

que la médula ósea presenta una alta frecuencia para el marcador CD45, el cual es superior al 70%. Esto concuerda con lo que reportamos en nuestros resultados, donde encontramos niveles de más del 80%. En cuanto a los marcadores mesenquimales, la ISCT reporta que en médula ósea los niveles de CD90 pueden ir del 2 al 30%, lo cual también es consistente con lo aquí reportado (Bourin et al., 2013)

El último marcador que presentó diferencia significativa y que de hecho llama la atención es el CD24, esto por los altos niveles que encontramos en las muestras de médula ósea, los cuales son mayores del 40%. Sí existen reportes donde muestras de médula ósea expresan este marcador epitelial de manera normal y en condiciones basales, sin embargo, los niveles reportados son cercanas al 5.1% (Yilmaz et al., 2011). Revisando la literatura se encontró que la presencia de CD24 en la médula ósea sugiere la presencia de progenitores osteogénicos en estas muestras (Ambrosi et al., 2017).

En lo referente a la expresión de los factores angiogénicos expresados por las células de ambas matrices celulares analizadas en este estudio, tenemos que el gen PECAM1, cuya proteína también es llamada PECAM-1 (molécula 1 de adhesión celular endotelial de plaquetas) o CD31, es un marcador que expresan por excelencia las células vasculares endoteliales, tanto las presentes en el estroma de la médula ósea, como del tejido adiposo. Sin embargo, su expresión no se restringe a células del endotelio, existe evidencia de que una porción (~50%) de las Células Troncales Mesenquimales presentes en la médula ósea que expresan IL-7 (interleucina 7) también expresan PECAM-1 (Tokoyoda, Hauser, Nakayama, & Radbruch, 2010).

Este marcador fue seleccionado debido a su participación en el desarrollo y maduración de las células endoteliales presentes en las muestras, lo que pudieran ayudar a promover el proceso de angiogénesis. De acuerdo con nuestros datos, los niveles entre MO y SVF no presentaban diferencias significativas. Sin embargo, no es suficiente

analizar la presencia de los marcadores a nivel transcripcional, en cambio, falta verificar la expresión a nivel de proteínas.

Por su parte, se hipotetiza que el gen TGFB1 tiene un papel muy importante en las células troncales hematopoyéticas de la médula ósea, más específicamente aquellas células que son CD34-, ya que en un estudio publicado en 2009, se reporta que esta proteína puede estar involucrada en el proceso que permite que las células CD34- entren en un proceso de “hibernación”, el cual les permite no entrar en el ciclo celular hasta que sean estimuladas para hacerlo. Esto sería mediante la inhibición de la acumulación de balsas lipídicas mediada por citocinas y la inducción de la hibernación evaluado en un modelo murino *ex vivo* (Yamazaki et al., 2009). Esto podría estar explicando en parte, la alta expresión en las células de la médula ósea que fueron analizadas. De la misma forma, también existen reportes donde se expresa este gen en las células provenientes de tejido adiposo. En un estudio donde comparan la expresión de ciertos factores en células de médula ósea, tejido adiposo, dermis y corazón, se reportó la expresión de este gen en todos estos tejidos, siendo más elevado en dermis (Riekstina et al., 2009).

Otro de los factores analizados en este trabajo fue el gen CXCL8 o interleucina 8 (IL-8), el cual es un marcador de inflamación. Existen estudios de que este marcador se encuentra mayormente expresado en células endoteliales de la médula ósea de pacientes que padecen mieloma múltiple, esto en comparación con células HUVEC que fueron utilizadas como un control sano (Pellegrino et al., 2005). Recordando que nuestras muestras fueron donadas por parte del servicio de Hematología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León y que no contamos con la información acerca del diagnóstico de los pacientes que fueron sometidos al procedimiento de obtención de las muestras, se considera esto como un posible factor que podría explicar la mayor expresión de este gen en comparación con el gen endógeno. Asimismo, también existen evidencias de que las Células Troncales Mesenquimales presentes en la médula ósea también expresan este marcador (Balasubramanian et al., 2012). En este mismo orden de ideas,

se ha reportado que las células del tejido adiposo humano expresan este marcador, tanto a nivel de RNA mensajero, como de proteína. Esta expresión se encontró tanto en fragmentos de tejido adiposo, como de adipocitos aislados en cultivo (Bruun, Pedersen, & Richelsen, 2001).

Por último, el factor angiogénico ANGPT1 o Angiopoyetina 1, es una molécula de adhesión o señalización que se expresa más comúnmente en osteoblastos (Kaplan, Psaila, & Lyden, 2007). Este factor cuando se une a su receptor Tie-2 puede inducir adhesión y quiescencia en el nicho celular de las Células Troncales Hematopoyéticas en la médula ósea. En un estudio donde se analizó la expresión de este factor en células tanto mesenquimales como hematopoyéticas de la médula ósea de ratones también encontraron una expresión menor en comparación con la de GAPDH (Méndez-Ferrer et al., 2010). En el caso de la expresión de ANGPT1 en el tejido adiposo, se ha reportado que los niveles de este marcador están relacionados con el crecimiento o reducción del tejido adiposo, es decir, con su plasticidad. En este estudio se encontró que los pre-adipocitos expresaban más este factor a comparación que los adipocitos maduros, los cuales están presentes en la fracción vascular estromal (Dallabrida et al., 2003).

Para demostrar el potencial angiogénico de una matriz celular, se hacen necesarios experimentos donde se demuestre la formación de vasos sanguíneos. Existe un estudio donde se evalúa la influencia de la naturaleza del soporte para las células sobre el potencial angiogénico, de ellos constructos implantados de manera subcutánea en el lomo de ratones. Los autores reportan, la formación a los 15 días de una cápsula fibrosa alrededor de andamios de fibroína sin celularizar, lo cual sugiere que la cápsula se forma por efectos de la fibroína y no por efectos de las células añadidas, lo cual concuerda con nuestros resultados. De la misma forma, reportan que la inflamación es ocasionada por la presencia de los andamios y no por efecto de la incisión realizada al implantar, debido a que la inflamación ocasionada por la incisión se observó al día 7 en el caso donde no se aplicó andamio y ya no estaba presente 15 días después de realizada la incisión. Asimismo, ellos también reportan una

intensa reacción inflamatoria, así como el desarrollo de vasos sanguíneos tanto en los cortes de los controles sin células como en los cortes de los andamios celularizados con células de la SVF en el mismo tiempo antes mencionado (Vigani et al., 2016).

Por último, también hay reportes que indican que el proceso de inflamación está fuertemente relacionado con el proceso de angiogénesis, incluso existe gran evidencia de que el proceso de angiogénesis ocasiona que el proceso inflamatorio se prolongue y se intensifique (Chen & Kaji, 2017). Esto sugiere que, aunque se haya presentado una fuerte inflamación en el caso de los implantes con células de la SVF, esto no necesariamente es algo negativo. Si bien existen más vasos sanguíneos en los cortes de los andamios celularizados con las células de la médula ósea, esto no quiere decir que vayan a ser funcionales a largo plazo. Una posibilidad es que los capilares formados por estas células se hayan formado en un tiempo más corto en comparación con los vasos desarrollados por los andamios celularizados con SVF, por lo cual valdría la pena evaluar la formación de estos vasos a tiempos más largos.

En lo referente a lo encontrado al sembrar las células de la Fracción Vascular Estromal sobre Matrigel, existen reportes de que estas células sí forman estructuras parecidas a vasos sanguíneos en un sistema de este tipo y que estas estructuras dependen de la dosis de células que se depositen en el pocillo, esto utilizando células de la SVF de ratas. Sin embargo, ellos observaron resultados en 3 días, mientras que en este trabajo fue observado a partir del día 7 (Maijub et al., 2015). Existen reportes que indican que el mecanismo por el cual se promueve más la angiogénesis en las células troncales de tejido adiposo es a través de la secreción de ciertos factores angiogénicos, siendo el VEGF y el HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) los más importantes, así como de la diferenciación de estas en células endoteliales que permitan la formación de los vasos sanguíneos.

9. CONCLUSIONES

Se estandarizó con éxito una metodología sencilla, rápida y reproducible para la obtención de la Fracción Vascular Estromal mediante el uso de la colagenasa grado GMP NB6, para su aplicación clínica; así mismo se determinó el inmunofenotipo de las células aisladas por esta metodología.

Mediante un modelo de implantación subcutánea, se observó que las células troncales de la médula ósea fueron capaces de generar una mayor cantidad de capilares y vasos de diverso calibre en comparación con las células de la SVF. Sin embargo, cabe resaltar que mediante este ensayo la influencia de los factores angiogénicos solubles presentes en la SVF no ejerce su función.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel Aziz, M. T., El-Haggar, S., Mostafa, T., Atta, H., Fouad, H., Mahfouz, S., ... Ali, G. A. (2010). Effect of mesenchymal stem cell penile transplantation on erectile signaling of aged rats. *Andrologia*, 42(3), 187–192. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.00977.x>
- Allard, B., Turcotte, M., & Stagg, J. (2012). CD73-generated adenosine: Orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/485156>
- Ambrosi, T. H., Scialdone, A., Graja, A., Gohlke, S., Jank, A. M., Bocian, C., ... Schulz, T. J. (2017). Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell*, 20(6), 771-784.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.02.009>
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A., & Hakakian, C. S. (2015). Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1509-2>
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A., Hakakian, C. S., & Birnbaum, Z. E. (2016). Adipose stromal vascular fraction isolation. *Annals of Plastic Surgery*, 77(3), 354–362. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000831>
- Balasubramanian, S., Venugopal, P., Sundarraj, S., Zakaria, Z., Majumdar, A. Sen, & Ta, M. (2012). Comparison of chemokine and receptor gene expression between Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 14(1), 26–33. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.605119>
- Bayer HealthCare Pharmaceuticals. (2010). *Staxyn: Highlights of prescribing information*. Wayne, NJ.
- Bivalacqua, T. J., Deng, W., Kendirci, M., Usta, M. F., Robinson, C., Taylor, B. K., ... Kadowitz, P. J. (2006). Mesenchymal stem cells alone or ex vivo gene modified with endothelial nitric oxide synthase reverse age-associated erectile dysfunction. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 292(3), H1278–H1290. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00685.2006>
- Bora, P., & Majumdar, A. S. (2017). Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0598-y>
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., ... Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. *Cytotherapy*,

15(6), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>

- Bruun, J. M., Pedersen, S. B., & Richelsen, B. (2001). Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(3), 1267–1273. <https://doi.org/10.1210/jc.86.3.1267>
- Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*, 25(2), 57–59.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739–2749. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>
- Charles-De-Sá, L., Gontijo-De-Amorim, N. F., Maeda Takiya, C., Borojevic, R., Benati, D., Bernardi, P., ... Rigotti, G. (2015). Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 135(4), 999–1009. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000001123>
- Chen, L. J., & Kaji, H. (2017). Modeling angiogenesis with micro- and nanotechnology. *Lab on a Chip*, 17(24), 4186–4219. <https://doi.org/10.1039/c7lc00774d>
- Chew, J., Tam, W., Yeap, L., Li, P., Ang, Y., Lim, B., ... Ng, H. (2005). Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells. *Society*, 25(14), 6031–6046. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6031>
- Colson, M. H., Cuzin, B., Faix, A., Grellet, L., & Huyghes, E. (2018). Current epidemiology of erectile dysfunction, an update. *Sexologies*, 27(1), e7–e13. <https://doi.org/10.1016/j.sexol.2018.01.018>
- Cross, M. J., & Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 201–207. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01676-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01676-X)
- Dallabrida, S. M., Zurakowski, D., Shih, S. C., Smith, L. E., Folkman, J., Moulton, K. S., & Rupnick, M. A. (2003). Adipose tissue growth and regression are regulated by angiopoietin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(3), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.007>
- Dallas, N. A., Samuel, S., Xia, L., Fan, F., Gray, M. J., Lim, S. J., & Ellis, L. M. (2008). Endoglin (CD105): A marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clinical Cancer Research*, 14(7), 1931–1937. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4478>
- Domen, J., Wagers, A., & Weissman, I. L. (2006). *Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. Regenerative Medicine*. Retrieved from https://stemcells.nih.gov/sites/all/themes/stemcells_theme/stemcell_includes

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dykstra, J. A., Facile, T., Patrick, R. J., Francis, K. R., Milanovich, S., Weimer, J. M., & Kota, D. J. (2017). Concise Review : Fat and Furious : Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(4), 1096–1108. Retrieved from <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.5966/sctm.2012-0069>
- Edling, C. E., & Hallberg, B. (2007). c-Kit-A hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(11), 1995–1998. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.005>
- Eli Lilly and Company. (2011). *Cialis: Highlights of prescribing information*. Indianapolis, IN. Retrieved from http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021368s20s211bl.pdf
- Fagiani, E., & Christofori, G. (2013). Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters*, 328(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.018>
- Fortier, L. A. (2005). Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415–423. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x>
- Frese, L., Dijkman, P. E., & Hoerstrup, S. P. (2016). Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother*, 43, 268–274. <https://doi.org/10.1159/000448180>
- Garcia, M. M., Fandel, T. M., Lin, G., Shindel, A. W., Banie, L., Lin, C. S., & Lue, T. F. (2010). Treatment of erectile dysfunction in the obese Type 2 diabetic ZDF rat with adipose tissue-derived stem cells. *Journal of Sexual Medicine*, 7(1 PART 1), 89–98. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01541.x>
- Gimble, J. M., Bunnell, B. A., Frazier, T., Rowan, B., Shah, F., Thomas-Porch, C., & Wu, X. (2013). Adipose-derived stromal/stem cells: A primer. *Organogenesis*, 9(1), 139–146. <https://doi.org/10.4161/org.24279>
- Hakim, L., Van Der Aa, F., Bivalacqua, T. J., Hedlund, P., & Albersen, M. (2012). Emerging tools for erectile dysfunction: A role for regenerative medicine. *Nature Reviews Urology*, 9(9), 520–536. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.143>
- Hernigou, P. (2015). Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka. *International Orthopaedics*, 39(4), 807–817. <https://doi.org/10.1007/s00264-015-2716-8>

- Huang, Y. C., Ning, H., Shindel, A. W., Fandel, T. M., Lin, G., Harraz, A. M., ... Lin, C. S. (2010). The effect of intracavernous injection of adipose tissue-derived stem cells on hyperlipidemia-associated erectile dysfunction in a rat model. *Journal of Sexual Medicine*, 7(4 PART 1), 1391–1400. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01697.x>
- Jin, E., Chae, D. sik, Son, M., & Kim, S. W. (2017). Angiogenic characteristics of human stromal vascular fraction in ischemic hindlimb. *International Journal of Cardiology*, 234, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.02.080>
- Kaplan, R. N., Psaila, B., & Lyden, D. (2007). Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends in Molecular Medicine*, 13(2), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.12.003>
- Kiefer, J. C. (2007). Back to Basics: Sox Genes. *Developmental Dynamics*, 236(8), 2356–2366. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21218>
- Kopp, J. L., Ormsbee, B. D., Desler, M., & Rizzino, A. (2008). Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 26(4), 903–911. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0951>
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., ... Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine*, 6(11), 1229–1234. <https://doi.org/10.1038/81326>
- Leblanc, A. J., Nguyen, Q. T., Touroo, J. S., Aird, A. L., Chang, R. C., Ng, C. K., ... Williams, S. K. (2013). Adipose-derived cell construct stabilizes heart function and increases microvascular perfusion in an established infarct. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(11), 896–905. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0046>
- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R., & Shelton, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Journal of the National Cancer Institute*, 12(1), 197–201. <https://doi.org/10.1093/jnci/12.1.197>
- Lue, T. F. (2000). Erectile Dysfunction. *The New England Journal of Medicine*, 342(24), 1802–1813. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2013.01.041>
- Mahla, R. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine. *International Journal of Cell Biology*, 3(4), 151–157. <https://doi.org/10.1155/2016/6940283>
- Maijib, J. G., Boyd, N. L., Dale, J. R., Hoying, J. B., Morris, M. E., & Williams, S. K. (2015). Concentration-dependent vascularization of adipose stromal vascular fraction cells. *Cell Transplantation*, 24(10), 2029–2039. <https://doi.org/10.3727/096368914X685401>
- Martínez-salamanca, J. I., González, J., Ramírez, P., & Angulo, J. (2014). Vascular Erectile Dysfunction. In *PanVascular Medicine* (pp. 1–39). Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37393-0>

- Master, Z., Jones, N., Tran, J., Jones, J., Kerbel, R. S., & Dumont, D. J. (2001). Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO Journal*, *20*(21), 5919–5928. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5919>
- Mehta, K., Shahid, U., & Malavasi, F. (1996). Human CD38, a Cell-Surface Protein With Multiple Functions. *The FASEB Journal*, *10*(12), 1408–1417.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., MacArthur, B. D., Lira, S. A., ... Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, *466*(7308), 829–834. <https://doi.org/10.1038/nature09262>
- Morrison, D. K., Kaplan, D. R., Escobedo, J. a, Rapp, U. R., Roberts, T. M., & Williams, L. T. (1989). Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF beta-receptor. *Cell*, *58*(4), 649–657. [https://doi.org/0092-8674\(89\)90100-1](https://doi.org/0092-8674(89)90100-1) [pii]
- Nassiri, F., Cusimano, M. D., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Fazio, A., Yousef, G. M., ... Lloyd, R. V. (2011). Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. *Anticancer Research*, *31*(6), 2283–2290.
- NIH Consensus Development Panel on Impotence. (1993). Impotence - NIH Consensus Conference. *Jama*, *270*(1), 83–90. Retrieved from <http://jama.jamanetwork.com>
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., & Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, *123*(5), 917–929. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.040>
- Nunes, S. S., Majjub, J. G., Krishnan, L., Ramakrishnan, V. M., Clayton, L. R., Williams, S. K., ... Boyd, N. L. (2013). Generation of a functional liver tissue mimic using adipose stromal vascular fraction cell-derived vasculatures. *Scientific Reports*, *3*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep02141>
- Oh, M., & Nör, J. E. (2015). The perivascular niche and self-renewal of stem cells. *Frontiers in Physiology*, *6*(DEC), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00367>
- Pellegrino, A., Ria, R., Di Pietro, G., Cirulli, T., Surico, G., Pennisi, A., ... Vacca, A. (2005). Bone marrow endothelial cells in multiple myeloma secrete CXC-chemokines that mediate interactions with plasma cells. *British Journal of Haematology*, *129*(2), 248–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05443.x>
- Pfizer Labs. (2010). *Viagra Tablets*. New York, NY. Retrieved from https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/020895s033lbl.pdf
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes

- of Tissue Repair-Current Views. *Stem Cells*, 25(11), 2896–2902. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0637>
- Qiu, X., Lin, H., Wang, Y., Yu, W., Chen, Y., Wang, R., & Dai, Y. (2011). Intracavernous Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Restores Erectile Function of Streptozocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Sexual Medicine*, 8(2), 427–436. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.02118.x>
- Raposo, E., Simonacci, F., & Perrotta, R. E. (2017). Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Annals of Medicine and Surgery*, 20, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2017.07.018>
- Rege, T. A., & Hagood, J. S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB Journal*, 20(8), 1045–1054. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5460rev>
- Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., ... Ancans, J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews and Reports*, 5(4), 378–386. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9>
- Riis, S., Zachar, V., Boucher, S., Vemuri, M. C., Pennisi, C. P., & Fink, T. (2015). Critical steps in the isolation and expansion of adipose-derived stem cells for translational therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 17(Table 1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/erm.2015.10>
- Rizzino, A. (2009). Sox2 and Oct-3/4: A versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(2), 228–236. <https://doi.org/10.1002/wsbm.12>
- Rizzino, A. (2013). Concise review: The Sox2-Oct4 connection: Critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells*, 31(6), 1033–1039. <https://doi.org/10.1002/stem.1352>
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., & Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24731–24737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502573200>
- Rodriguez, J., Pratta, A. S., Abbassi, N., Fabre, H., Rodriguez, F., Debard, C., ... Mojallal, A. (2017). Evaluation of Three Devices for the Isolation of the Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue and for ASC Culture: A Comparative Study. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9289213>
- Romashkova, J. A., & Makarov, S. S. (1999). NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, 401(6748), 86–90.

<https://doi.org/10.1038/43474>

- Ryu, J. K., Tumurbaatar, M., Jin, H. R., Kim, W. J., Kwon, M. H., Piao, S., ... Suh, J. K. (2012). Intracavernous Delivery of Freshly Isolated Stromal Vascular Fraction Rescues Erectile Function by Enhancing Endothelial Regeneration in the Streptozotocin-Induced Diabetic Mouse. *Journal of Sexual Medicine*, 9(12), 3051–3065. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2012.02962.x>
- Semon, J. A., Zhang, X., Pandey, A. C., Alandete, S. M., Maness, C., Zhang, S., ... Bunell, B. A. (2013). Administration of Murine Stromal Vascular Fraction Ameliorates Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(10), 789–796. Retrieved from <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.5966/sctm.2013-0032>
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells*, 32(6), 1380–1389. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0884>
- Tokoyoda, K., Hauser, A. E., Nakayama, T., & Radbruch, A. (2010). Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 193–200. <https://doi.org/10.1038/nri2727>
- Trowbridge, I. S., & Thomas, M. L. (1994). CD45: An Emerging Role as a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development. *Annual Review of Immunology*, 12(1), 85–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.000505>
- Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M., & Hu, W.-S. (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(1), 12–27. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.12>
- Van Dijk, A., Naaijken, B. A., Jurgens, W. J. F. M., Nalliah, K., Sairras, S., van der Pijl, R. J., ... Niessen, H. W. M. (2011). Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. *Stem Cell Research*, 7(3), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.06.003>
- Vigani, B., Mastracci, L., Grillo, F., Perteghella, S., Preda, S., Crivelli, B., ... Chlapanidas, T. (2016). Local biological effects of adipose stromal vascular fraction delivery systems after subcutaneous implantation in a murine model. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 31(6), 600–612. <https://doi.org/10.1177/0883911516635841>
- VIVUS Inc. (2012). *Stendra: Highlights of prescribing Information*. Mountain View, CA.
- Wentzell, E., & Salmerón, J. (2009). Prevalence of erectile dysfunction and its treatment in a Mexican population: distinguishing between erectile function change and dysfunction. *Journal of Men's Health*, 6(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jomh.2008.09.009>

- Wespes, E., Amar, E., Eardley, I., Giuliano, F., & Hatzichristou, D. (2010). Guía clínica sobre la disfunción sexual masculina: disfunción eréctil y eyaculación precoz. *Asociación Europea Urología*, 57(5), 846–900.
- Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S. I., Eto, K., Ema, H., & Nakauchi, H. (2009). TGF- β as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood*, 113(6), 1250–1256. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-146480>
- Yilmaz, G., Vital, S., Yilmaz, C. E., Stokes, K. Y., Alexander, J. S., & Granger, D. N. (2011). Selectin-mediated recruitment of bone marrow stromal cells in the postischemic cerebral microvasculature. *Stroke*, 42(3), 806–811. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.597088>
- Yoo, S. Y., & Kwon, S. M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation*, 2013(1). <https://doi.org/10.1155/2013/127170>
- You, D., Jang, M. J., Kim, B. H., Song, G., Lee, C., Suh, N., ... Kim, C.-S. (2015). Comparative Study of Autologous Stromal Vascular Fraction and Adipose-Derived Stem Cells for Erectile Function Recovery in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(4), 351–358. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0161>
- Zhang, L., Hu, J., & Athanasiou, K. A. (2009). The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Critical ReviewsTM in Biomedical Engineering*, 37(1–2), 1–57.