



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

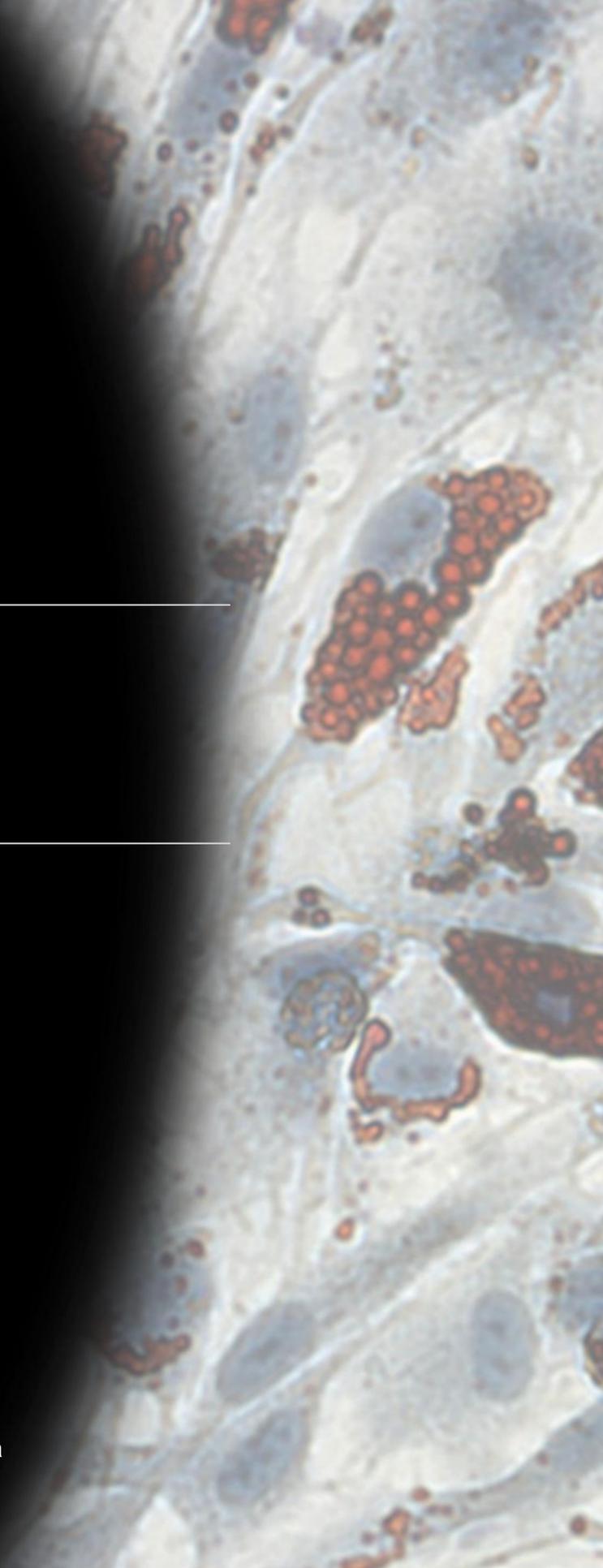
Facultad de Ciències Biològiques
Departament de Biologia Cel·lular i
Parasitologia

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
DE DISTINTAS POBLACIONES
CELULARES EN EL TEJIDO
ADIPOSO HUMANO**

Tesis doctoral

Carmen Bellver Estellés
Valencia, 2015

Dirigida por la Dra. Carmen Escobedo Lucea
y por el Dr. José Manuel García Verdugo



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular y Parasitología



**”AISLAMIENTO Y
CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS
POBLACIONES CELULARES EN EL
TEJIDO ADIPOSEO HUMANO”**

Programa de doctorado en Neurociencias Básicas y Aplicadas

Tesis doctoral realizada por:

Carmen Bellver Estellés

Dirigida por los Dres.:

Carmen Escobedo Lucea

José Manuel García Verdugo

Dra. Carmen Escobedo Lucea, Investigadora Principal del laboratorio de Ingeniería Tisular de la Universidad de Helsinki.

Dr. José Manuel García Verdugo, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Valencia.

Certifican:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por Dña. Carmen Bellver Estellés titulada “Aislamiento y caracterización de distintas poblaciones celulares en el tejido adiposo humano”, ha sido realizada en el laboratorio de Neurobiología comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia a 28 de Octubre de 2015

Fdo: Carmen Escobedo Lucea Fdo: José Manuel García Verdugo

Yo, Carmen Bellver Estellés, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación realizada en el laboratorio de Morfología Celular del Centro de Investigación del Príncipe Felipe, bajo la dirección de la Dra. Carmen Escobedo Lucea, Investigadora Principal del laboratorio de Ingeniería Tisular de la Universidad de Helsinki y el Dr. José Manuel García Verdugo, catedrático de Biología Celular de la Universidad de Valencia.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en

Valencia a 28 de Octubre de 2015

Fdo: Carmen Bellver Estellés

Agradecimientos

Nunca pensé que llegaría este momento, y sobre todo que esta parte de escritura me costara tanto, pero no me quiero dejar a ninguna de las personas que tanto me han apoyado, me han alentado y me han cuidado para que pudiera finalizar este proyecto que comenzó en Enero de 2007.

En primer lugar he de agradecer infinitamente a mi director de tesis, el Dr. José Manuel García Verdugo. Después de mi estancia en Dublín, únicamente él confió en mí, dándome un trabajo y un proyecto de tesis doctoral. Recuerdo sus palabras: “Yo no quiero técnicos, necesito doctorandos. Si quieres escribir una tesis doctoral tienes un hueco en mi laboratorio”. Pensé que no podía dejar escapar ese tren. Gracias por darme aquella oportunidad y por valorarme.

No puedo olvidarme de la Dra. Isabel Moreno. Gracias a ella esta tesis doctoral ha sido posible al donarnos todas y cada una de las liposucciones que hemos utilizado en este trabajo de investigación y en posteriores proyectos.

También agradecer infinitamente al Dr. Vicente Mirabet del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana por sus incesantes suministros de suero humano. Gracias a él se fundamenta esta tesis.

A mi gente del I-32, que aunque ya en el olvido, continuáis presentes en mi vida: Irene, gracias por enseñarme y por las interminables horas incluyendo que hemos pasado juntas, a Mario por creer en mis manos de cazo. A Salomé, gracias por tener tanta paciencia conmigo, por enseñarme y por escucharme y sobre todo a Jorge, por estar siempre tan dispuesto a ayudarme, tanto en ciencia como fuera de ella.

No me puedo olvidar de Miriam, porque sin tí todo habría sido diferente. Gracias por tu amistad y por tu aliento pero sobre todo porque en estos años te has convertido en una persona indispensable en mi vida. Una tesis nos ha unido pero nada podrá alejarnos.

Tampoco puedo dejar de mencionar a Melissa. Ella comenzó con el proyecto que posteriormente continué yo. Gracias a él te conocí. Recuerdo las primeras extracciones, MC, tú y yo, acabando a las tantas y aquel grupo tan variopinto que formamos, haciéndonos llamar “Las grasientas”... muy pero que muy apropiado. Gracias por tu incesante apoyo y por tu amistad que aunque lejos te siento tan cerca.

A la gran familia de Neurobiología del Cavanilles, Vivian, Patri, Susana, Sara, María, Vite, Clara A., Clara V., Toni, Arancha, Vicente. Gracias a todos y cada uno de vosotros que me recibisteis con los brazos abiertos, y siempre habéis estado dispuestos a ayudarme.

No puedo olvidarme de Carol, nuestra técnico. He de agradecer tu dedicación y tu gran ayuda para que en el poco tiempo que quedaba de beca pudiera centrarme en escribir. Muchas gracias.

Por supuesto, gracias al Dr. Andrés Sanz por toda la ayuda brindada en el análisis de los datos del microarray, así como en otros aspectos de esta tesis.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, mis amigas. Agradeceros todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad que me habéis brindado durante estos años.

Como no, a mi directora de tesis, a mi jefa, y mi amiga, Carmen Escobedo. Flor, sin tu ayuda esto no habría sido posible. Mi sueño de convertirme en doctora se hace realidad gracias a tí. Ha sido muchas horas untas en el cuarto de cultivo, conociéndonos, hablando de la vida. Pocas veces se puede decir que una jefa se convierta en una amiga y yo lo he comprobado. Gracias por enseñarme, por tu comprensión y por toda tu ayuda. Sé que aunque estés lejos, siempre podré contar contigo.

A mi pequeña familia recién formada. Gracias Pedro por ayudarme y tratarme cuando me ponía intratable, y sobre todo por esos ánimos que me has inspirado durante estos últimos meses.

Por último, gracias a mi familia pero especialmente a dos personas imprescindibles en mi vida. Mi tía Angelines, porque es la culpable de sembrar la semilla de la ciencia en mi vida. Cuando era pequeña quería parecerme a ti y aún hoy continúo pensando lo mismo. Gracias por tus consejos, tu apoyo y tus charlas.

Pero sobre todo a mi madre, porque eres mi modelo a seguir, eres mi alma gemela y porque te quiero con locura. Sobre todo, sin ti, sin tu ayuda y sin tu apoyo no concibo haber sido capaz de acabar esta tesis. Gracias mamá.

A mi hijo, a Miguel

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN.....	14
I. INTRODUCCIÓN.....	20
I.1.A.i.1. I.1. TERAPIA CELULAR E INGENIERÍA TISULAR	20
I.2. LAS CÉLULAS MADRE Y SU POTENCIAL COMO HERRAMIENTA EN MEDICINA REGENERATIVA.....	22
I.2.A. Definición de célula madre	22
I.2.B. Tipos de célula madre y clasificación	22
I.2.C. Criterios a cumplir por una célula madre para ser candidata a terapia celular.	30
I.3. TEJIDO ADIPOSO. FUENTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	30
I.3.A. Tejido multilocular o pardo	31
I.3.B. Tejido unilocular o blanco.....	32
I.4. CÉLULAS MADRE DEL TEJIDO ADIPOSO (ASC).....	32
I.4.A. Descubrimiento, perfil antigénico y ventajas	32
I.4.B. Nomenclatura	34
I.4.C. Características	34
I.4.D. Aplicaciones clínicas de las hASC.....	37
I.4.E. Necesidad de la adaptación de metodologías de cultivo de las células para su uso en terapia celular	44
I.5. HETEROGENEIDAD DE LA FRACCIÓN VASCULAR ESTROMAL (SVF), CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS POBLACIONES CELULARES PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE HASC	46
I.5.A. Expresión de genes de desarrollo temprano en MSCs: Muse cells	46
I.5.B. Side population.....	46
I.5.C. Antígeno embrionario específico de estadio “Stage Specific Embryonic Antigen 1” (SSEA1).....	48
II. OBJETIVOS.....	52
II.1. OBJETIVOS PRINCIPALES	52
II.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	52
III. MATERIAL Y METODOS	56

III.1. PARTE 1-DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN VASCUÑAR ESTROMAL (SVF) SIN COMPONENTES DE ORIGEN ANIMAL	56
III.1.A. Origen de las muestras y consentimiento informado	56
III.1.B. Recolección y almacenaje de suero humano.....	56
III.1.C. Aislamiento de las hASC mediante el método clásico (Zuk et al 2001).....	56
III.1.D. Aislamiento de las hASC mediante nuestro método	57
III.1.E. Tampón de lisis de eritrocitos	58
III.1.F. Mantenimiento en cultivo y expansión celular.....	58
III.1.G. Estudio de la proliferación celular	58
III.1.H. Análisis de expresión de marcadores de superficie	59
III.1.I. Técnicas bioquímicas y moleculares	60
III.1.J. Diferenciación a precursores mesodérmicos.....	64
III.1.K. Técnicas histológicas	65
III.2. PARTE 2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS POBLACIONES EN LA SVF DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO.....	67
III.2.A. Aislamiento de las poblaciones candidatas mediante fluorescence- activated cell sorting (FACS).....	67
III.2.B. Estudios de diferenciación dirigida <i>in vitro</i> para comprobar la potencialidad de las células SSEA+	69
IV. RESULTADOS	74
IV.1. OBJETIVO I. DISEÑO DE UN MÉTODO DE AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO SIN REACTIVOS DE ORIGEN ANIMAL	74
IV.1.A. Evaluación y sustitución de los reactivos de origen animal	74
IV.1.B. Efecto del uso de tampón de lisis de eritrocitos en las células madre de tejido adiposo aisladas sin reactivos animales	79
IV.1.C. Caracterización de las hASC obtenidas sin reactivos animales ni tampón de lisis	82
IV.1.D. Las hASC aisladas mantenían su capacidad multipotente	87
IV.1.E. Caracterización de la expresión durante los diferentes pases del cultivo de las ASC mediante la utilización de la tecnología de microarray.....	99
IV.2. OBJETIVO II. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS SUBPOBLACIONES PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE hASC	105
IV.2.A. Aislamiento de células ABCG2 ⁺	105
IV.2.B. Aislamiento de células SSEA1 ⁺	111
V. DISCUSIÓN.....	122

VI.	CONCLUSIÓN	130
VII.	ANEXOS	134
VII.1.	ANEXO 1. RECAPITULACIÓN DE LOS ENSAYOS REGISTRADOS EN LA PAG WEB “ <i>CLINICAL TRIAL</i> ” INVOLUCRANDO A LAS ASC.....	134
VII.2.	ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO	142
VII.3.	ANEXO 3. TAB. 3. TABLA DE CEBADORES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO..	146
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	152

ABREVIATURAS

ABCG2	Miembro 2 de la subfamilia de proteínas de unión al ATP	del inglés: ATP-Binding cassette subfamily member 2
ADAS	Células madre adultas derivadas del tejido adiposo	del inglés: Adipose derived adult stem cells
AdMSC	Células madre mesenquimales del tejido adiposo	del inglés: Adipose mesenchymal stem cells
ADSC	Células madre derivadas del tejido adiposo	del inglés: <u>A</u> dipose <u>d</u> erived <u>s</u> tem <u>c</u> ells
AF	Fluido amniótico	del Inglés: Amniotic fluid
AFS	Células madre del fluido amniótico	del inglés: Amniotic fluid stem cells
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero	-
hASC	Células madre humanas del tejido adiposo	del inglés: Human <u>A</u> dipose <u>S</u> tem <u>C</u> ells
mASC	Células madre del tejido adiposo murinas	del inglés: murine Adipose Stem Cells
BAT	Tejido adiposo marrón	del inglés: Brown adipose tissue
BCRP		del inglés: <u>B</u> reast <u>C</u> ancer <u>R</u> eceptor <u>P</u> rotein
BHA	hidroxianisola butilada	Butylated Hydroxyanisole
BM-MSC	Células madre mesenquimales de la médula ósea	Bone Marrow mesenchymal stem cells
BM-MNC	Células mononucleares de la médula ósea	Bone marrow mononuclear cells
BSA	Albúmina del suero bovino	del inglés: <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CD	Cluster de diferenciación	
DC	Células dendríticas	Del inglés: Dendritic cells
DMEM		del inglés: <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
ECC	Células madre de carcinoma embrionario	<i>del inglés: Embryonic Carcinomal Cells</i>
ESC	Células madre embrionarias	del inglés: Embryonic Stem Cell
FBS	Suero bovino fetal	del inglés: Fetal Bovine Serum
FGF-2	Factor de crecimiento fibroblástico-2	del inglés: <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor-2
GBM	Glioblastoma	del inglés: Glioblastoma
HBSS		del inglés: <u>H</u> ank's <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos	del inglés: <u>H</u> epatocyte <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
HS	Suero Humano	del ingles: Human Serum
HSA	Albúmina de suero humano	del inglés: Human Serum Albumin
HSC	Célula madre hematopoyética	del inglés: <u>H</u> ematopoietic <u>S</u> tem <u>C</u> ell
IFN	Interferón	del inglés: interferon
IGF1	Factor de crecimiento de insulina 1	del inglés: <u>I</u> nsulin <u>G</u> rowth <u>F</u> actor-1
IL-10	Interleucina 10	Interleukin-10
iPSC:	Células madre pluripotentes inducidas	
LPA	Lipoaspirado	
ICM	masa celular interna	del inglés: Inner cell mass
MB	Medio basal	
MC	Medio Control	
MD	Medio de diferenciación	

ME	Microscopio electrónico	
MO	Microscopio óptico	
MSCs	Células madre mesenquimales	del inglés: <u>M</u> esenchymal <u>S</u> tem <u>C</u> ells
Muse		Del inglés: <u>M</u> ultilineage differentiating <u>s</u> tress- <u>e</u> nduring Natural Killer cells
NK cells:		
P1	Pase 1	
P3	Pase 3	
P5	Pase 5	
pb	Pares de bases	
PB	Tampón fosfato	del inglés: <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer
PBS	Tampón fosfato salino	del inglés: <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> aline
PDT	Tiempo de doblaje de la población celular	del inglés: <u>P</u> opulation <u>D</u> oubling <u>T</u> ime
PFA	Paraformaldehído	
PGC	Células madre germinales primordiales	Del inglés: Primordial germ cells
PLA cells	células aislada de lipoaspirados procesados	del inglés: <u>P</u> rocessed <u>L</u> ipo <u>A</u> spirates <u>C</u> ells
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	Del inglés: Quantitative polymerase chain reaction
REr	Retículo endoplásmico rugoso	
SP		del inglés: Side Population
SSEA1		del inglés: <u>S</u> tage- <u>S</u> pecific <u>E</u> mbryonic <u>A</u> ntigen- <u>1</u>
SVF	Fracción vascular estromal	del inglés: <u>S</u> tromal <u>V</u> ascular <u>F</u> raction
SVZ	Zona sub-ventricular	del inglés: <u>S</u> ub <u>V</u> entricular <u>Z</u> one
TERT	Enzima telomerasa	del ingles: Telomerase reverse transcriptase
TL	Tampón de Lisis	
TNF	Factor de necrosis Tumoral	del inglés: <u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	del inglés: <u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
VWF	Factor Von Willebrand	del inglés: <u>V</u> on <u>W</u> illebrand <u>F</u> actor
WAT	Tejido adiposo blanco	del inglés: <u>W</u> hite <u>A</u> dipose <u>T</u> issue

RESUMEN

Las células madre adultas, han sido empleadas en numerosos procedimientos de terapia clínica, ya que no desencadenan rechazo inmunológico y tampoco presentan problemas éticos relacionados con su uso. El tejido adiposo, constituye una fuente idónea para la extracción de células madre mesenquimales, debido a su abundancia y al bajo riesgo quirúrgico que conlleva su extracción. El peligro de transmisión de zoonosis que existe al emplear reactivos de origen animal en el procesamiento y cultivo de células humanas que podrían llegar a ser trasplantadas a pacientes, produjo que nos planteásemos sustituir reactivos animales empleados en los procedimientos tradicionales, por otros de origen humano o sintéticos.

Los objetivos de esta tesis doctoral son por un lado, el diseño de un protocolo de aislamiento de células madre del tejido adiposo humano sin emplear reactivos de origen animal que permita acercar su uso a la clínica. Además, también se ha llevado a cabo el aislamiento y caracterización de distintas subpoblaciones celulares presentes en la fracción conseguida empleando el protocolo diseñado.

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

II.1. TERAPIA CELULAR E INGENIERÍA TISULAR

La esperanza de vida se ha duplicado desde principios del siglo XX, llegando en los países desarrollados a sobrepasar los 80 años. El envejecimiento de la población es uno de los principales factores de riesgo para sufrir enfermedades relacionadas, como las enfermedades coronarias, infartos cerebrales, o hipertensión (Barton 2014). (Tian and Li 2014).

El envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y el desarrollo socio-económico, sin embargo constituye un reto para la sociedad, ya que se hace necesaria una adaptación para mejorar al máximo la salud (Barton 2014). Una de las consecuencias del aumento de la esperanza de vida es una mayor proporción de personas mayores de 60 años, por encima de cualquier otro grupo. En el denominado primer mundo. Además, multitud de estudios revelan que este envejecimiento es un proceso global inevitable en los países desarrollados (Figura 1).

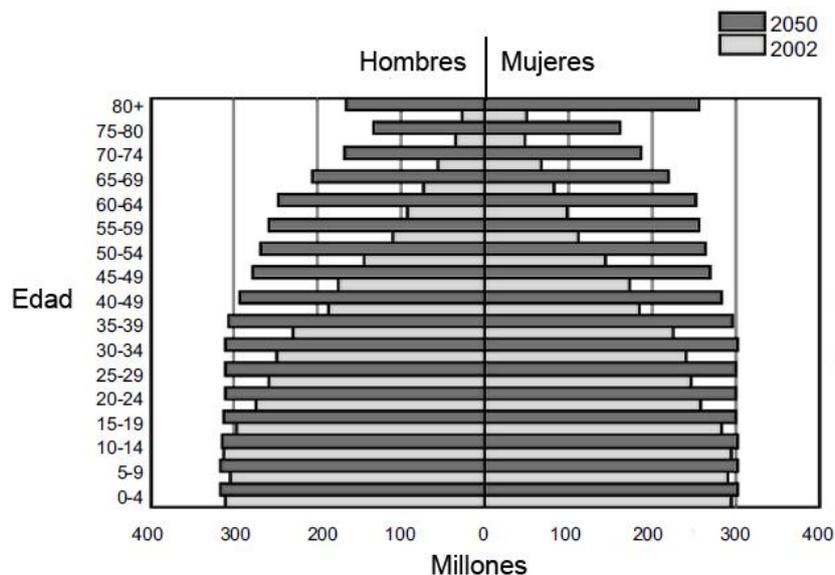


Figura 1: Desarrollo de la población mundial hasta 2050, diferenciando entre hombres y mujeres. Se espera que la población mundial crezca desde 6.2 billones en 2002 hasta 9 en 2050. Es importante destacar que el número de individuos con edades superiores a 50 años se incrementará 5 veces más, resultando una población sumamente envejecida, mayoritariamente mujeres (Barton 2014).

Por ello, las enfermedades degenerativas son uno de los principales problemas sanitarios en estos países. Estas enfermedades se caracterizan por la alteración o pérdida de distintos tipos celulares, provocando la disfunción de órganos ó tejidos. Hasta el momento, los tratamientos empleados en estas enfermedades son paliativos, pero no se encargan de reparar o restituir las funciones celulares perdidas. En los últimos años se ha producido un extraordinario avance en los conocimientos relacionados con diferentes disciplinas de la biomedicina, entre ellas, la biología celular, lo que ha dado un notable impulso a una nueva rama de la medicina denominada *medicina regenerativa*. Esta disciplina médica se ha

basado fundamentalmente en los nuevos conocimientos sobre las células madre y en su capacidad de convertirse en células de diferentes tejidos

El objetivo de la medicina regenerativa, es restaurar la función de órganos y tejidos dañados como consecuencia de lesiones traumáticas o enfermedades degenerativas crónicas, mediante la inyección de células o de factores producidos por éstas. La aplicación de células como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades es lo que se denomina la terapia celular (Helder, Knippenberg et al. 2007).

De acuerdo a la normativa establecida por la Agencia española del Medicamento (orden SCO/3461/2003 de 26 de noviembre del Real Decreto 763/1993),

La terapia celular se define como: *“La utilización en seres humanos de células somáticas vivas, tanto autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales), cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo por medios metabólicos, farmacológicos e inmunológicos. Dicha manipulación incluye la expansión o activación de poblaciones celulares autólogas ex vivo (p. ej., inmunoterapia adoptiva), la utilización de células alogénicas y xenogénicas asociadas con productos sanitarios empleados ex vivo o in vivo (p. ej., microcápsulas, matrices y andamiajes intrínsecos, biodegradables o no biodegradables)”*.

CRONOLOGÍA DE LA MEDICINA REGENERATIVA: CONTEXTO HISTÓRICO.

El concepto de la capacidad de regeneración ha estado presente desde la antigüedad. En la mitología griega Prometeo era capaz de regenerar su hígado cada noche y como castigo de los dioses, un águila volvía a devorarlo cada día, pero la verdadera revolución que ha facilitado el desarrollo del campo, ha sido el descubrimiento de las células madre.

En 1908 Alexander Makximov postuló la existencia de las células madre hematopoyéticas, creando el término “célula madre”.

En 1931 el profesor Paul Niehans inyectó una suspensión de células paratiroides procedentes de becerro en un paciente cuya glándula paratiroidea estaba considerablemente dañada. El resultado de este trasplante fue un éxito lo que llevó a sustituir la técnica de eliminar la glándula por únicamente la inyección celular (Niehans 1952).

1963. Los doctores Till & McCulloch descubrieron la existencia de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea de ratón.

En 1968 se realiza con éxito el primer trasplante de médula ósea en unos gemelos que sufrían inmunodeficiencia severa combinada.

1976. El Dr. Friedenstein aísla en ratones las células madre mesenquimales de médula ósea.

1997. La Dra. Margaret Goodell desarrolla el método de aislamiento “side population” para aislar las células hematopoyéticas de la médula ósea.

2001. Dres. Zuck and Hedrick. Consiguen aislar la fracción estromal de las células madre de tejido adiposo. Los logros clínicos alcanzados hasta el momento, el volumen de conocimientos generados durante el estudio de la biología de células madre y la aparición de nuevas disciplinas paralelas como la ingeniería tisular, han abierto la puerta al desarrollo de futuras terapias para tratar enfermedades degenerativas actualmente incurables (Mizuno 2009).

II.2. LAS CÉLULAS MADRE Y SU POTENCIAL COMO HERRAMIENTA EN MEDICINA REGENERATIVA

II.2.A. Definición de célula madre

Según Alberts y col. 1994 “una célula madre es toda aquella que no está totalmente diferenciada, tiene capacidad de división ilimitada y cuando se divide, cada célula hija puede permanecer como célula madre o puede iniciar una vía que conduce de forma irreversible a la diferenciación terminal”. Por tanto, las células madre poseen capacidad de auto-renovación y la habilidad de dar lugar a distintos tipos celulares (Gimble and Guilak 2003, Somorjai, Lohmann et al. 2012). El concepto de “células madre” como tal, aparece por primera vez en los trabajos de Friedenstein (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976), que las describe a partir de la médula ósea. Hoy en día se han aislado células madre prácticamente de todos los tejidos y órganos, desde embriones tempranos, hasta adultos. También se ha logrado la transformación de células adultas en células con características de embrionarias (Rubinstein 1993, Zuk, Zhu et al. 2001, Zuk, Zhu et al. 2002, Sampaolesi, Torrente et al. 2003, Perez-Tomas 2006, Wolbank, Peterbauer et al. 2007, Jiang, Liu et al. 2010).

II.2.B. Tipos de célula madre y clasificación

A lo largo del desarrollo ontogénico, podemos identificar y aislar distintos tipos de células madre. Atendiendo a su origen, las células madre pueden dividirse en seis grupos, tal y como se muestra en la Figura 2.

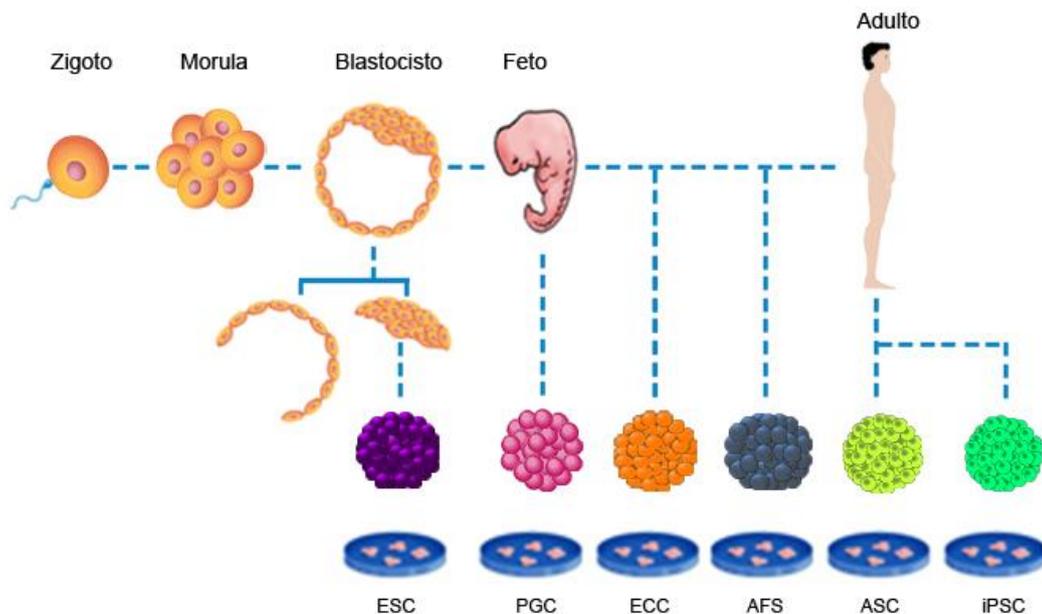


Figura 2: Desarrollo ontogénico y tipos de células madre aisladas. (Adaptado de Escobedo-Lucea con permiso). ESC: Células madre embrionarias; PGC: Células madre germinales primordiales; ECC: Células madre de teratocarcinoma embrionario; AFS: Células madre del fluido amniótico; ASC: Células madre del tejido adiposo; iPSC: Células madre pluripotentes inducidas.

II.2.B.i. Células madre embrionarias (ESC)

En 1965 Cole y Edwards, lograron obtener, caracterizar y expandir las primeras líneas de células madre embrionarias, utilizando embriones de conejo. Sin embargo, ni ellos ni ninguno de los grupos que lo ha intentado posteriormente, han sido capaces de mantener dichas líneas creciendo en el laboratorio. Años más tarde dos grupos consiguieron, de manera independiente, aislar líneas celulares diploides y mantenerlas estables, utilizando para ello blastocistos de ratón (Evans and Kaufman 1981) (Martin 1981). Debido a su origen, estas células se denominaron células madre embrionarias en inglés “*embryonic stem cells*” (ESC). Según Marshall y col; 2001 (Marshall, Waknitz et al. 2001) y Smith, 2001 (Smith 2001) , las ESC se caracterizan por:

Proceder de la masa celular interna de embriones en estadio de blastocisto (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998), cuatro-ocho células o mórula (Strelchenko, Verlinsky et al. 2004).

Tener capacidad de división simétrica ilimitada (dada su actividad telomerasa), y mantenerse indiferenciadas en las condiciones de cultivo *in vitro* adecuadas.

Su cariotipo es normal y permanece estable.

Capacidad pluripotente; son capaces de diferenciarse a derivados de las tres hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo, endodermo y células germinales (gametos).

Capacidad para integrarse en todos los tejidos fetales dando lugar a quimeras, cuando se trasplantan durante el desarrollo (en ratón).

Capacidad para colonizar la línea germinal dando lugar a ovocitos y espermatozoides.

Expresión de otros marcadores de indiferenciación como el factor de transcripción Oct-3/4, que activa o inhibe gran número de genes y mantiene las células madre embrionarias en estado de proliferación e indiferenciación.

Se puede inducir su proliferación o diferenciación.

Capacidad para formar teratomas tras su trasplante.

Tienen su propia identidad inmunológica, por lo que pueden inducir rechazo.

Dado su origen, la posibilidad de futuros usos clínicos, ha provocado intensos debates éticos y morales. Aun así, este mismo año, el grupo del doctor Robert Lanza publicaba resultados esperanzadores del primer ensayo clínico realizado con células de epitelio de la retina diferenciadas a partir de hESC para el tratamiento de la degeneración macular (Schwartz, Regillo et al. 2015).

II.2.B.ii. Células madre germinales primordiales (PGC)

Las células madre germinales (primordial germ cells, PGC) se obtienen de la cresta gonadal de embriones humanos de 5-9 semanas de gestación y son los precursores de los gametos.

Las PGC tienen propiedades bioquímicas, morfológicas, inmunológicas y de desarrollo comunes a las células madre embrionarias: son pluripotentes y contribuyen a la formación de la línea germinal cuando se inyectan en blastocistos para dar lugar a animales quiméricos (Matsui, Zsebo et al. 1992, Stewart, Gadi et al. 1994). Así mismo, pueden diferenciarse a cuerpos embrioides y formar teratomas *in vivo*. Sin embargo, existen diferencias a nivel del patrón de metilación. Dichas diferencias podría reflejar los cambios en el programa de desarrollo de las PGC versus las ESC.

A pesar de ello, la existencia de este patrón de metilación génica no parece afectar a la capacidad de estas células para contribuir al desarrollo de la línea germinal en quimeras (Sato, Yoshimizu et al. 2003).

Existe una gran variabilidad en la expresión de los genes sujetos a *imprinting* en las líneas de células germinales primordiales, ya que en algunos de los descendientes de ratones quiméricos resultantes de la inyección de estas células, se puede ver que los genes de las PGC se transmiten de forma normal, mientras que en otros casos, los animales descendientes presentan anomalías a nivel del crecimiento y la estructura ósea (Sato, Yoshimizu et al. 2003).

Aunque la mayor parte de los estudios se han realizado en ratón, cada vez existe un mayor interés en la obtención de PGC humanas (Shamblott, Axelman et al. 1998, Shamblott, Axelman et al. 2001).

II.2.B.iii. Células madre de teratocarcinoma embrionarios (ECC)

Las células madre de teratocarcinomas embrionarios (ECC) son tumores que aparecen en las gónadas de algunas cepas de ratones consanguíneos o tras depositar embriones desnudos bajo la cápsula suprarrenal de ratones inmunodeficientes (Anderson, BonDurant et al. 1996). Estos tumores están constituidos por una amalgama de tejidos somáticos yuxtapuestos de manera desorganizada. Derivan de células germinales, son pluripotentes y por ello pueden dar lugar a los múltiples tipos celulares encontrados (Kleinsmith and Pierce 1964, Stevens 1984).

Las primeras líneas de células madre aisladas a partir de teratocarcinomas se obtuvieron en los años setenta (Kahan and Ephrussi 1970, Jakob, Boon et al. 1973, Gearhart and Mintz 1974, Nicolas, Avner et al. 1976).

Mantenidas en cultivo o *in vivo*, las células madre de los teratocarcinomas conservan su capacidad de diferenciación produciendo derivados de las tres hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo (Nicolas, Avner et al. 1976) Además estas ECC conservan su capacidad de contribución al desarrollo embrionario y tras microinyectarlas en la masa celular interna (MCI) de blastocistos de ratón, dan lugar a animales quiméricos viables y fértiles (Mintz and Illmensee 1975). Sin embargo, las ECC no conservan la capacidad pluripotente de las células embrionarias tempranas y sufren cambios durante su transición *in vivo* al estado tumoral (Andrews 2002).

II.2.B.iv. Células madre del fluido amniótico (AFS)

Estas células se aislaron por primera vez en 2007, en la Universidad de Wake Forest (De Coppi, Bartsch et al. 2007), a partir de muestras de amniocentesis. Desde entonces, este mismo grupo de investigación ha conseguido aislarlas a través de muestras de villi coriónico e incluso a partir de placentas de embarazos a término. Se caracterizan por tener las siguientes propiedades:

- Gran capacidad proliferativa. División cada 36h.
- Marcadores comunes con adultas y hESC. *Embrionarias*: SSEA-4, OCT-3/4, TRA 1-60 y adultas: CD29, CD44, CD90, CD105, cKIT.
- Amplia capacidad pluripotente y plasticidad (son capaces de diferenciarse a derivados de ectodermo, mesodermo y endodermo).
- Presentan actividad telomerasa y telómeros largos.
- Su cariotipo se mantiene normal incluso en pasajes altos.

A pesar de que son un tipo celular muy prometedor, están todavía bajo la evaluación de la comunidad científica por lo que el uso de las mismas no está muy extendido .

II.2.B.v. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) son células somáticas adultas reprogramadas hasta estadios de desarrollo tempranos. Pueden obtenerse a partir de una fuente autóloga, por lo que representan una potencial fuente para futuras terapias de trasplante personalizado (Taura, Noguchi et al. 2009). La reprogramación hacia estadios tempranos se lleva a cabo mediante la introducción de factores de transcripción de desarrollo temprano como OCT4, Sox2, Klf4 y cMyc utilizando vectores virales (Takahashi, Tanabe et al. 2007). Otros grupos han conseguido generar iPSCs empleando otra combinación de factores de transcripción tempranos OCT4, Sox2, Nanog y Lin-28 (Yu, Vodyanik et al. 2007).

Durante el proceso, las células reprogramadas son capaces de volver a expresar actividad telomerasa, adquiriendo en algunos de los casos, la capacidad de inducir la formación de teratomas ratones inmunodeprimidos (Takahashi and Yamanaka 2006, Nakagawa, Koyanagi et al. 2008).

El potencial terapéutico de las iPSC es muy prometedor debido a su capacidad de renovación y a su pluripotencia. Desde el punto de vista inmunológico, pueden ser autólogas, por lo que no ocasionarían rechazo. Aún así, existen problemas derivados de su naturaleza y de la tecnología que se emplea para derivarlas que deben tenerse en cuenta durante la realización de futuros ensayos clínicos. Como ya hemos mencionado, la mayoría de las líneas obtenidas son capaces de dar lugar a teratomas y a día de hoy, todavía no se conoce cómo controlar la formación de estos tumores. Además, durante su derivación se utilizan vectores víricos, que podrían tener efectos desconocidos en el comportamiento de las células posteriormente diferenciadas (Yamanaka 2009). En este sentido, los esfuerzos del campo se están dirigiendo hacia conseguir la reprogramación introduciendo de forma directa en la célula o por adición en el medio de cultivo, las proteínas necesarias para desencadenar la vuelta atrás en el desarrollo, aunque la eficacia de este proceso de momento es muy baja. Otro de los puntos importantes es saber qué tipo celular o cuales son las condiciones más adecuadas para la generación de líneas iPSCs ya que existe una gran variabilidad en el éxito del procedimiento entre tejidos. En humanos se han derivado con éxito a partir de fibroblastos (Yu, Vodyanik et al. 2007), de células progenitoras sanguíneas (Loh, Agarwal et al. 2009) de keratinocitos (Aasen, Raya et al. 2008) y de grasa (Sugii, Kida et al. 2011).

Sin embargo, aunque las iPSC ofrecen claras ventajas para su uso en terapia, los ensayos clínicos en marcha se están llevando a cabo de forma muy controlada (Aasen, Raya et al. 2008), empleando las células diferenciadas para tratar tejidos inmunoprivilegiados o aislados del torrente sanguíneo. Dichos ensayos, se centran fundamentalmente en el tratamiento de la degeneración macular. El primer ensayo documentado se está llevando a cabo en la Universidad Japonesa de Kobe desde 2013 y está dirigido por la doctora Masayo Takahashi. En 2014 su grupo publicó un artículo sobre la posible aplicación de las iPSC en el tratamiento de la degeneración macular en las que iPSC humanas eran inducidas a células del epitelio pigmentario de la retina. Las células obtenidas presentaban las mismas características fenotípicas, morfológicas, funcionales y similar patrón de expresión genética que las auténticas células epiteliales pigmentarias retinales (Kamao, Mandai et al. 2014).

Existe otro grupo en Reino Unido que también está tratando esta enfermedad mediante terapia celular con iPSC (NCT02464956).

II.2.B.vi. Células madre adultas (AS)

En la mayoría de los tejidos de individuos adultos, existen pequeñas poblaciones de células indiferenciadas que poseen la capacidad de diferenciarse a tipos celulares maduros cuando la situación lo requiere, dividiéndose a su vez para mantener el balance de células progenitoras indiferenciadas necesario (Fuchs and Segre 2000). Dichas poblaciones de células, se mantienen a lo largo de la vida del individuo.

Las células madre adultas, desempeñan un papel esencial en el organismo, no sólo por su contribución en la formación de órganos y tejidos, sino sobre todo, por encargarse del mantenimiento, crecimiento y renovación de los mismos durante todo el proceso de desarrollo ontogénico (Firulli and Olson 1997, Orkin 1998, Edlund and Jessell 1999).

Estas células madre han sido aisladas a partir de numerosos tejidos adultos como: médula ósea (Turner, McIlwaine et al. 1995), piel (Metcalf and Ferguson 2008), corazón (Barile, Chimenti et al. 2007), músculo (Figeac, Daczewska et al. 2007), cerebro (Pollard, Conti et al. 2006), tejido adiposo (Zuk, Zhu et al. 2002). Aunque la mayor parte de las células madre se identificaron en secciones histológicas, su aislamiento se produjo posteriormente.

Las primeras células madre adultas que pudieron aislarse fueron las células madre mesenquimales de la médula ósea (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976) para ello los investigadores se valieron de su capacidad de adherirse a un sustrato. Además de esta propiedad, se caracterizan por crecer formando colonias con morfología fibroblástica y también por su capacidad de diferenciarse a derivados mesodérmicos: cartílago, hueso, músculo y tejido adiposo (Krebsbach, Kuznetsov et al. 1999). Aunque se pensaba que las ASC sólo generaban células características del tejido en donde se encontraban o de otros con el mismo origen embrionario, algunos autores han descrito la presencia de células pluripotentes en los tejidos adultos (Poulsom, Forbes et al. 2001, Jiang, Jahagirdar et al. 2002, Poulsom, Alison et al. 2002, Mezey, Key et al. 2003).

Es por ello que se ha propuesto una jerarquía entre células madre adultas que pueden originar distintos tipos celulares del mismo linaje o multipotentes y aquellas que dan lugar a células distintas de la capa germinal a la que pertenecen (pluripotentes).

II.2.B.vi.1. Células madre adultas multipotentes

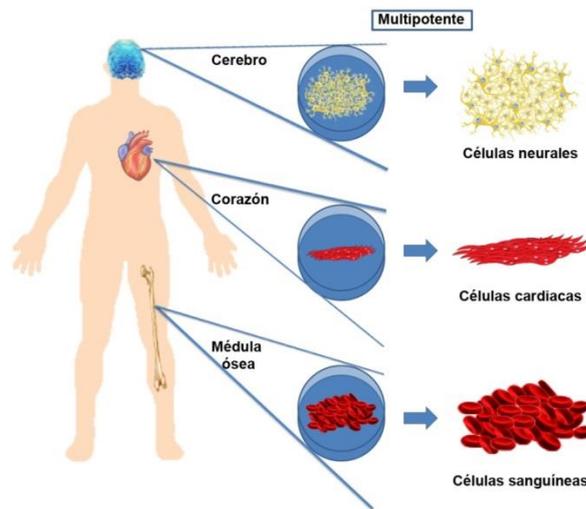


Figura 3: Esquema mostrando algunos de los distintos tipos de células madre adultas humanas aisladas hasta el momento.

- **Células madre musculares:** Se consiguieron aislar distintas poblaciones en ratón gracias a su capacidad de adhesión y proliferación (Qu-Petersen, Deasy et al. 2002), manteniéndolas en cultivo durante varias divisiones, sin que apareciesen anomalías cromosómicas. A pesar de que fueron capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo*, no se ha podido demostrar de forma contundente su capacidad de diferenciación a nivel clonal, por lo que su plasticidad está todavía en entredicho.
- **Células progenitoras de la piel:** En la dermis humana y murina se han aislado células madre con capacidad para diferenciarse en poblaciones celulares de dos de las hojas embrionarias, neuroectodermo y mesodermo (Toma, Akhavan et al. 2001). A pesar de que su potencial de diferenciación clonal ha sido comprobado *in vitro*, su capacidad multipotente no ha podido ser demostrada todavía *in vivo*.
- **Células madre de la médula ósea :** La médula ósea contiene distintos tipos de células madre como las células madre hematopoyéticas y las mesenquimales. Algunas de ellas se están usando en clínica desde hace más de medio siglo (Poulsom, Forbes et al. 2001)
- **Células madre hematopoyéticas (HSC):** Las HSC han podido identificarse y caracterizarse usando tanto métodos *in vitro* como *in vivo* (Prosper, Stroncek et al. 1996). Son capaces de dar lugar a cualquiera de los tipos celulares que componen la sangre y tienen capacidad de autorenovación (Weissman 2000). Además, pueden participar en la angiogénesis y vasculogénesis, lo que hace pensar en la existencia de un progenitor común denominado hemangioblasto (Flamme and Risau 1992). El grupo de Orlic y Anversa (Orlic, Kajstura et al. 2001) han demostrado en un modelo de ratón, que tras la inyección de células mononucleadas HSC en corazones infartados, estas HSC adquirieron un fenotipo característico de células de miocardio y contribuyeron a la mejora y supervivencia de los animales. Sin embargo, ni este ni otros trabajos posteriores han sido capaces de demostrar que la regeneración se deba exclusivamente a un único tipo celular de HSC.

- **Células madre mesenquimales (MSC):** Las MSC se encontraron por primera vez en la médula ósea, pero actualmente se han aislado de otros tejidos como el cordón umbilical, el músculo, el tejido adiposo. Pueden identificarse utilizando diversos marcadores de superficie como SH2, CD29, CD90 ó CD73 (Deans and Moseley 2000). Mediante estudios *in vitro*, se ha podido diferenciar estas células mesenquimales, obteniendo derivados mesodérmicos funcionales, osteoblastos, adipocitos, condroblastos (Pittenger, Mackay et al. 1999) y ectodérmicos, aunque en este último caso no se ha demostrado su funcionalidad. A nivel clínico, se ha utilizado con éxito el potencial de estas células mesenquimales, en pacientes con osteogénesis imperfecta, mediante trasplante alogénico de médula (Horwitz, Prockop et al. 1999). Sólo el 0.01% de las células de la médula ósea son BM-MSC.
- **Side Population (SP):** Las denominadas células SP han sido aisladas en la médula ósea empleando para ello técnicas de citometría de flujo (FACS). Se sabe que las SP son capaces de diferenciarse a HSC en humanos, roedores y otras especies, e incluso algunos estudios sugieren que podrían dar lugar a células especializadas e integrarse en tejidos in (Majka, Jackson et al. 2003).

II.2.B.vi.2. Células madre adultas pluripotentes

La capacidad de las células madre adultas para dar lugar a distintos tipos celulares parece estar menos restringida de lo que hasta hace poco tiempo se creía (Reyes, Lund et al. 2001, Forbes, Vig et al. 2002, Wakao, Kitada et al. 2011). Se ha demostrado que algunas poblaciones de células madre presentes en distintos tejidos no se comportan como entidades fijas o con alto grado de diferenciación, y tras ser expuestas a microambientes diferentes a los nichos en los que se encuentran, son capaces de colonizarlos, diferenciándose a células características de los tejidos en los que se han introducido; esta propiedad es lo que conocemos hoy en día como plasticidad de las células madre adultas (Bjornson, Rietze et al. 1999, Brazelton, Rossi et al. 2000, Clarke, Johansson et al. 2000, Krause, Theise et al. 2001, Forbes, Vig et al. 2002, Poulsom, Alison et al. 2002, Mezey, Key et al. 2003).

Los tipos celulares conseguidos gracias a esta plasticidad, suelen tener las características morfológicas de las células diferenciadas presentes originalmente en los tejidos, e incluso presentan sus marcadores de superficie. Existen datos que evidencian que estas células diferenciadas a partir de células madre adultas pueden dar lugar a células maduras totalmente funcionales.

El descubrimiento de las células progenitoras multipotentes adultas (MAPCs) revolucionó las anteriores creencias sobre la capacidad de diferenciación de las células madre adultas. Las MAPC son una pequeña población de células de la médula ósea que se purifican junto con las células mesenquimales multipotentes (Reyes, Lund et al. 2001, Jiang, Jahagirdar et al. 2002).

Se encontraron en la médula ósea adulta de ratón, rata, humano, y perro, aunque hay evidencias de que otros órganos como músculo y cerebro también las contienen (Jiang, Jahagirdar et al. 2002, Qu-Petersen, Deasy et al. 2002). Estas células pueden proliferar durante más de 100 divisiones sin mostrar signos de senescencia y son capaces de

diferenciarse en tejidos de las tres hojas embrionarias *in vitro*. A pesar de lo alentador de estos resultados, la existencia de las MAPCs ha sido puesta en entredicho por la comunidad científica, ya que nadie ha conseguido reproducir la totalidad de los resultados obtenidos por Reyes y colaboradores.

II.2.C. Criterios a cumplir por una célula madre para ser candidata a celular

Para que una célula madre esté considerada buena candidata para su aplicación en técnicas de terapia celular Gimble y cols establecieron una serie de requisitos que debían cumplir: I) ser muy abundante en la fuente de origen en términos de millones o billones de células, II) ser extraída con un procedimiento poco invasivo, III) ser capaz de diferenciarse hacia diferentes tipos celulares de una manera reproducible, IV) ser trasplantadas de una manera segura y efectiva a un huésped bien sea autólogo o alogénico, V) ser manipuladas de acuerdo con la guía práctica de buena manipulación (Gimble, Katz et al. 2007)

Actualmente las mejores candidatas para ser aplicadas en terapia celular, son las células madre pluripotentes inducidas (iPSC: del inglés “induced pluripotent adult stem cells”) y las células madres adultas, debido principalmente a que pueden ser de origen autólogo.

Algunos tipos de células madre adultas, como son las células madre procedentes de la médula ósea y hematopoyéticas, llevan empleándose en clínica más de 30 años con muy buenos resultados sin producir rechazo o generar efectos adversos (Badiavas, Ford et al. 2007, Dash, Dash et al. 2009, Yamasaki, Mera et al. 2014).

En el caso de las células madre adultas, su principal limitación reside en obtener el número de células suficientes para poder realizar el tratamiento necesario. Las células AF también parecen una fuente prometedora, pero por el momento, todavía deberán estudiarse más sus propiedades antes de permitir que den el salto a clínica (De Coppi, Bartsch et al. 2007). Como hemos mencionado anteriormente, este año se han publicado los resultados de los primeros ensayos clínicos llevados a cabo con hESC, pero dado el debate ético que persigue a estas células, parece difícil que su uso en clínica se generalice, especialmente si se pueden conseguir células mediante otras fuentes menos controvertidas.

II.3. EL TEJIDO ADIPOSO COMO FUENTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

El tejido adiposo es uno de los tejidos más abundantes y representa entre 15 y 20% del peso corporal del hombre y entre el 20-25% del peso corporal de la mujer (Geneser 2000).

Está considerado un tipo de tejido conjuntivo especializado, formado en su mayoría por adipocitos, aunque también contiene adipocitos indiferenciados y lipoblastos, que son los encargados de aumentar la reserva de adipocitos maduros cuando la ingesta calórica se incrementa.

La distribución del tejido adiposo no es uniforme a lo largo del individuo. Los depósitos de grasa se encuentran principalmente a escala dérmica, subcutánea, mediastínica, mesentérica, peri-gonadal, peri-renal y retroperitoneal (Moreno and Martinez 2002) aunque varían dependiendo del sexo, la edad o el estado nutricional.

El origen embrionario del tejido adiposo, junto con músculo y huesos, es el mesodermo. Las células mesenquimales provenientes de esta capa embrionaria son capaces de diferenciarse a adipocitos, osteoblastos, condrocitos y mioblastos, aunque el número exacto de pasos hasta que las MSC se convierten en adipocitos maduros no está bien establecido (Murohara 2009).

El tejido adiposo es esencial en el ser humano, ya que cumple una serie de funciones muy importantes, como son: I) el almacenamiento de energía, ya que los triglicéridos que forman las gotas lipídicas poseen más enlaces químicos energéticos que los hidratos de carbono y las proteínas. II) Función mecánica amortiguadora de golpes y de sostén. Este tipo de tejido se sitúa en la región glútea, riñones, órbitas oculares, rodillas, palmas de las manos. III) Función endocrina. El tejido adiposo es capaz de secretar distintas sustancias relacionadas en diferentes procesos, como la regulación del peso corporal, donde se pueden distinguir: adiponectina y leptina; en el sistema inmunitario: factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina 1 y 6; en la función vascular: angiotensina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 o en el desarrollo de la resistencia a la insulina: resistina.

Existen dos tipos de tejido adiposo: blanco y marrón, con un mismo origen embrionario pero con funciones metabólicas muy distintas.

II.3.A. Tejido unilocular o blanco

El tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés: White Adipose Tissue) está encargado principalmente de la reserva energética. en el WAT se produce la síntesis de adipoquinas, hormonas y citoquinas tanto por lo adipocitos como por otras células presentes en el tejido adiposo, como macrófagos y linfocitos T, de ahí su importancia a nivel endocrino, autocrino y paracrino (Geneser 2000).

A nivel morfológico, los adipocitos que forman parte del tejido adiposo blanco varían de tamaño llegando a superar las 100 μm de diámetro. Su morfología celular es poliédrica, debido a un entramado de fibras conectivas que rodean las células. La principal característica de los adipocitos del tejido adiposo blanco es la presencia de un única gota lipídica localizada en el centro espacio intracelular, desplazando el citoplasma y orgánulos a un espacio muy reducido en la periferia. El núcleo de morfología ovalada también está localizado periféricamente. Un orgánulo muy típico de encontrar en este tipo celular es el retículo endoplasmático liso, responsable de la lipogénesis. Es frecuente localizar retículo endoplasmático liso rodeando las nuevas gotas lipídicas en formación (Geneser 2000).

El tejido adiposo blanco se forma en la etapa de gestación aunque el mayor desarrollo de éste se da tras el nacimiento, siendo un proceso continuo a lo largo de toda la etapa adulta. Se sabe que el adulto tiene la capacidad de generar nuevas células grasas en respuesta a dietas con alto contenido en carbohidratos y grasas. La adquisición de células grasas parece ser, además, un proceso irreversible. Una vez que el tejido adiposo blanco está

completamente formado, los adipocitos representan entre uno y dos tercios del mismo. El resto del tejido lo constituyen células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y precursores de los adipocitos con distintos grados de diferenciación, fibroblastos, preadipocitos (células intersticiales o vacías de lípidos), células mesenquimales indiferenciadas (poseen pequeñas gotas de lípidos) y células grasas muy pequeñas (Moreno and Martinez 2002).

II.3.B. Tejido multilocular o pardo.

El otro tipo de tejido adiposo que podemos encontrar en los mamíferos es el tejido adiposo pardo o multilocular. El tejido adiposo marrón (BAT, por sus siglas en inglés: Brown Adipose Tissue), es el encargado de disipar la energía que sobra en forma de calor por un proceso denominado termogénesis el cual es muy abundante durante el desarrollo fetal y su distribución se va restringiendo después del nacimiento (Ponrartana, Hu et al. 2013).

Las células del tejido adiposo pardo poseen una morfología poligonal, al igual que los adipocitos del tejido adiposo blanco, pero sin embargo son más pequeñas que éstas. La principal característica de este tipo celular es la presencia en el citoplasma de numerosas pequeñas gotas lipídicas y gran cantidad de mitocondrias, lo que le da la coloración parda a estas células, debido a la gran cantidad de citocromo C (Geneser 2000). Esta elevada presencia de mitocondrias se debe a la funcionalidad del tejido adiposo pardo, que trata del mantenimiento de la homeostasis térmica. Debido a la carencia o bajo número de la enzima ATP sintasa en la cadena respiratoria de las mitocondrias, el proceso de fosforilación oxidativa para la producción de ATP no llega a término, con lo que la energía producida se libera en forma calorífica, lo que es de vital importancia en animales que hibernan o en recién nacidos para la regulación vital del calor corporal (Moreno and Martinez 2002).

Recientes estudios, han evidenciado la presencia de tejido pardo en personas adultas, concretamente en el tejido adiposo paracervical y supraclavicular (Virtanen, Lidell et al. 2009)].

II.4. CÉLULAS MADRE DEL TEJIDO ADIPOSEO

II.4.A. Descubrimiento, perfil antigénico y ventajas

En 1966, Rodbell fue el primero en aislar tejido adiposo de rata para estudiar el metabolismo de las células de la grasa mediante la creación de parches adiposos. Como describe en su artículo, después de la digestión con colagenasa se procedía a lavar y centrifugar la muestra. En cada paso de centrifugación separaba la fracción flotante de adipocitos maduros de la fracción vascular estromal (SVF: Stromal Vascular Fraction), la cual al final de todo el proceso contenía una población heterogénea constituida de células sanguíneas, fibroblastos, células endoteliales, progenitores de adipocitos (Rodbell 1966). A pesar de que no era su objetivo, mediante estos experimentos, Rodbell caracterizó las células integrantes de la fracción estromal, sentando las bases para el aislamiento de las hASC. Actualmente los protocolos han sido optimizados permitiendo el aislamiento de ASC's en diferentes

especies como perros (Neupane, Chang et al. 2008), ratones (Zuk, Zhu et al. 2001), conejo, oveja (Martinez-Lorenzo, Royo-Canas et al. 2009), incluso en humanos (Zuk, Zhu et al. 2002), observándose similitudes en cuanto al inmunofenotipo de estas células cuando las diferentes especies son comparadas (Martinez-Lorenzo, Royo-Canas et al. 2009). La SVF de células madre mesenquimales del tejido adiposo humano se aisló por primera vez en 2001 (Zuk, Zhu et al. 2001). Las hASC, se han perfilado como uno de los tipos de MSCs con mayor potencial de uso clínico, capaz incluso de situarse al nivel de las BM-MSCs. Desde el punto de vista de la obtención celular, el tejido adiposo ofrece algunas ventajas sobre la médula ósea: I) Baja morbilidad en la extracción y poca invasividad de la intervención; II) cantidad de células obtenidas a partir de un procedimiento de extracción. Por cada gramo de tejido adiposo, se pueden obtener 5000 células madre mesenquimales lo que supone 500 veces más que cuando se utiliza 1 gramo de médula ósea y por último, III) la tasa de proliferación celular, que es mayor en las hASC (Strem and Hedrick 2005, Kern, Eichler et al. 2006, Bunnell, Flaata et al. 2008, Rada, Reis et al. 2009).

Las hASC expresan marcadores típicos de otras MSC como CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, y SH3, pero son negativas para CD31, CD16, CD56, CD62e y CD104 (Zuk, Zhu et al. 2002).

Las hASC también se caracterizan por la ausencia de expresión de marcadores hematopoyético como c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD79, CD19, y HLA-DR (Schaffler and Buchler 2007).

Los niveles de expresión de determinados marcadores de indiferenciación pueden variar durante los diferentes pases del cultivo, especialmente en el caso de CD166, CD90, CD73, CD44 y CD29 (Mitchell, McIntosh et al. 2006). Las hASC tienen la capacidad de secretar múltiples factores angiogénicos y citoquinas antiapoptóticas, favoreciendo la regeneración de los tejidos y minimizando el daño tisular (Rehman, Traktuev et al. 2004).

Las hASC también secretan potentes factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1). Los niveles de estos factores están influenciados por las condiciones de cultivo, como la exposición de las células a bajas concentraciones de O₂, a factores de diferenciación o al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Mizuno 2009). Recientemente se ha publicado que las hASC son capaces de producir mayor cantidad de citoquinas (interferon- γ), factores de crecimiento (b-FGF, HGF, IGF-1) que sus homólogas de la médula ósea (Li, Wu et al. 2015).

A pesar de todos los avances alcanzados en la caracterización de las hASC, al igual que en otras MSC, su aislamiento todavía depende de la capacidad de adherirse al plástico de cultivo y de su potencial de proliferación.

II.4.B. Nomenclatura

Durante los primeros años posteriores a su descubrimiento, la nomenclatura de las células madre del tejido adiposo que puede encontrarse en la literatura ha sido muy confusa. El primer nombre que recibieron fue PLA (Processed LipoApirates cells: células procedentes del lipoaspirado). Otros términos que podemos encontrar frecuentemente en la literatura son: células madre adultas derivadas del tejido adiposo (ADAS: Adipose Derived Aadult Stem cell), células estromales adultas derivadas del tejido adiposo, células estromales adultas derivadas del tejido adiposo (ADSC: Adipose Derived Stromal Cells, células madre mesenquimales adiposas (AdMSC: Adipose Mesenchymal Stem Cells). Dado el gran problema que se estaba empezando a crear en la literatura, la Federación IFATS: International Federation of Adipose Therapeutics and Science (IFATS) acordó establecer el término células madre adiposas (ASC) para identificar a la población de células madre multipotentes obtenidas del tejido adiposo y que presentan capacidad de adherencia al plástico (Bunnell, Flaata et al. 2008).

II.4.C. Características

II.4.C.i. Capacidad inmunomoduladora

Las células mesenquimales están consideradas potentes reguladores de la respuesta inmune, debido a la secreción de citoquinas que inhiben la activación de los linfocitos T. También inhiben la funcionalidad de los linfocitos B y la maduración de las células dendríticas, y por último, protegen eficazmente contra el rechazo de los aloinjertos y la autoinmunidad (Yanez, Lamana et al. 2006). Diversos trabajos han demostrado que las hASC poseen las mismas capacidades inmunomoduladoras que las BM-MS (Puissant, Barreau et al. 2005): I) las hASC no inducen la proliferación de linfocitos alogénicos cuando ambas poblaciones se mantienen en co-cultivo; II) las hASC son capaces de frenar la proliferación linfocitaria incluso en casos en los que los linfocitos han sido previamente estimulados con agentes mitógenos. Este efecto se desencadena incluso sin necesidad de que exista contacto directo con los linfocitos; III) el efecto inhibitor es dependiente del número de hASC ó MSC; IV) el medio condicionado por las hASC no inhibe la reacción linfocitaria desencadenada durante el co-cultivo de linfocitos obtenidos de distintos pacientes, demostrando que la presencia de las células es imprescindible para detener este efecto (Puissant, Barreau et al. 2005).

Los ensayos *in vitro* realizados hasta el momento, han demostrado que el efecto inmunomodulador de las hASC es dependiente de la dosis celular empleada, siendo del 100% cuando se cultiva el mismo número de linfocitos y hASC. Algunos autores defienden que este efecto únicamente se da cuando las células están en contacto directo (Wolbank, Peterbauer et al. 2007). Sin embargo otros han documentado la inhibición en sistemas transwell, defendiendo que el contacto directo célula- célula no es necesario para que las hASC ejerzan su efecto inmunomodulador (Puissant, Barreau et al. 2005).

Esta propiedad se estudió por primera vez *in vivo* empleando un modelo de enfermedad injerto contra huésped desarrollado en ratón. Tras ser irradiados con una dosis letal, los ratones recibieron un trasplante de BM de donante, desarrollando la enfermedad injerto

contra huésped. Para evaluar el efecto de las células mesenquimales en incidencia de la enfermedad, algunos de ellos fueron tratados con inyecciones periódicas de mASC. Análisis histológicos de diferentes tejidos post mortem demostraron que la infusión de mASC mejoraba significativamente el pronóstico de la enfermedad de injerto contra huésped y reducía su letalidad (Yanez, Lamana et al. 2006).

González-Rey y cols en 2009 propusieron el uso de células madre mesenquimales de la grasa como una posible estrategia terapéutica en enfermedades que inducen la inflamación y destrucción de la mucosa intestinal. Aprovechando las cualidades inmunomoduladoras de las ASC, inyectaron las células intraperitonealmente en un modelo murino de colitis crónica (Gonzalez-Rey, Anderson et al. 2009). Una única inyección de hASC retrasó la aparición de los signos típicos de esta enfermedad y redujo la mortalidad. Por otro lado reducían la inflamación del colon mediante la sub-expresión de un amplio abanico de mediadores citotóxicos e inflamatorios de las células inmunes de la mucosa intestinal y por el aumento de la citoquina anti-inflamatoria interleucina 10 (IL-10). Los resultados obtenidos sugirieron que las células eran toleradas por el sistema inmune del huésped. De la misma manera, debido a reducción de citoquinas inflamatorias y quemoquinas y a la disminución de la infiltración leucocitaria la inyección de ASC era beneficiosa en casos de sepsis (Gonzalez-Rey, Anderson et al. 2009).

Este grupo de investigación también ha estudiado el efecto de las hASC en el tratamiento *in vitro* de la artritis reumatoide. En este caso demostraron que las hASC ejercen una respuesta supresora muy fuerte sobre las células T reactivas contra el colágeno II mediante diferentes vías: suprimen la proliferación de las células T reactivas contra el colágeno II, inhiben la producción de citoquinas inflamatorias IFN- γ , TNF- α , estimulan la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL10 por parte de monocitos y células T, y además inhiben la producción de factores inflamatorios mediante la activación de células sinoviales en la destrucción del cartílago y hueso en pacientes con artritis reumatoide (Gonzalez-Rey, Gonzalez et al. 2010). También demostraron que los niveles de secreción de proteínas disminuían a medida que aumentaba el número de pases de las hASC.

Capacidad de diferenciación multipotente e indicios de pluripotencia

Al igual que otras MSC's, las hASC tienen gran capacidad para dar lugar a distintas células de origen mesodérmico tal y como se muestra en la figura 4. En función del medio de cultivo y los factores empleados, las hASC han conseguido diferenciarse dando condrocitos, adipocitos, osteocitos (Mahmoudifar and Doran, Zuk, Zhu et al. 2001, Zuk, Zhu et al. 2002, Mahmoudifar and Doran 2010), precursores miogénicos con características de músculo esquelético (Zuk, Zhu et al. 2001) y liso (Rodriguez, Alfonso et al. 2006). A pesar de que las mASC han podido dar lugar también a músculo cardiaco (Fraser, Schreiber et al. 2006), la capacidad de diferenciación a este tipo celular a partir de hASC no ha podido demostrarse.

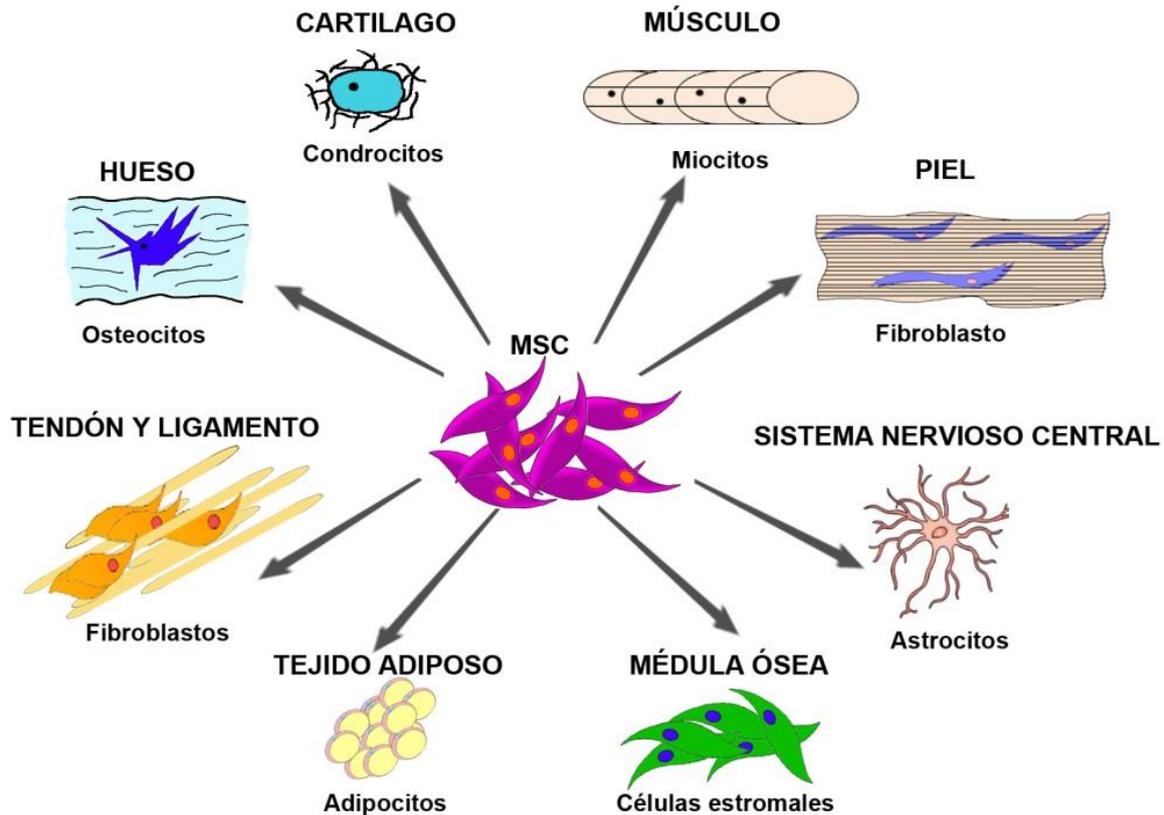


Figura 4: Capacidad de diferenciación de las células MSCs hacia diferentes tejidos.

Así mismo, varios grupos de investigación han demostrado que las distintas subpoblaciones celulares presentes en la SVF exhiben diferencias en su capacidad de diferenciación. El grupo de Jiang, separó mediante citometría las células CD105⁺ de la negativa, observando que la fracción CD105⁺ tenía gran capacidad de diferenciación a cartílago (Jiang, Liu et al. 2010).

Numerosos estudios han llevado a cabo la diferenciación de BM-MSCs derivadas de la médula ósea a células endoteliales (Oswald, Boxberger et al. 2004). Las hASC CD34⁺/CD90 son capaces de diferenciarse a células endoteliales si se cultivan en los adecuados medios inductores, dando lugar a células que expresan CD31, CD34, CD144 (VE-cadherina) y eNOS. Las células diferenciadas son capaces de producir VEGF y forman capilares si se cultivan en matrices de metil-celulosa (De Francesco, Tirino et al. 2009), e incorporan LDL (Xue, Zhang et al. , Cao, Sun et al. 2005, Fischer, McIlhenny et al. 2009).

II.4.C.iii. Capacidad de diferenciación a endodermo

Desde 2005 algunos trabajos han demostrado que las hASC también parecen tener capacidad de dar lugar a derivados endodérmicos. Uno de los estudios más conocidos es el realizado por el grupo de la Dra. Gomez-Lechón en 2007. Tras inducir la diferenciación de hASC hacia células hepáticas, obtuvieron células que además de expresar genes específicos como ALB, TTR o CYP 2E1, poseían algunas de las enzimas clave para el metabolismo de fármacos (Talens-Visconti, Bonora et al. 2007).

A partir de las hASC también han podido obtenerse células pancreáticas que expresan Isl-1, Ipf-1, and Ngn3 y son capaces de producir insulina, glucagón y somatostatina (Timper, Seboek et al. 2006).

II.4.C.iv. Capacidad de diferenciación a ectodermo

El daño tisular que se produce en el sistema nervioso debido a diferentes enfermedades o daños traumáticos, generalmente se debe a la incapacidad de regeneración de las neuronas. Además, aunque existe una población de células madre neurales residentes en el sistema nervioso central, ésta no tiene la capacidad de respuesta suficientemente rápida para generar neuronas funcionales rápidamente (Kokai, Rubin et al. 2005). El primer estudio de diferenciación de ASC hacia células neurales (Safford, Hicok et al. 2002, Safford, Safford et al. 2004), demostró tras la exposición de las hASC a un medio neurogénico, las células sufrían una serie de cambios, tanto morfológicos como fenotípicos, expresando algunos marcadores neurales como GFAP, Nestina y NeuN, pero no corroboraron que estas células fueran funcionales (Zuk, Zhu et al. 2002). En 2003 el grupo de Ashjian detectó la presencia de canales de voltaje dependientes de K⁺ en las hASC (Ashjian, Elbarbary et al. 2003). A pesar de ello, no observaron expresión de marcadores neurales maduros como GFAP, MAP-2 o TAU, ni tampoco eventos de despolarización y repolarización que indicasen funcionalidad de estos canales. El grupo del Dr. Jang publicó un trabajo en el que lleva a cabo la diferenciación de las hASC hacia células neurales funcionales (Jang, Cho et al. 2010). Las células diferenciadas poseían unos niveles de expresión significativamente más elevados del marcador neural temprano Nestina, de marcadores neuronales (Tuj1, MAP2, NFL, NFM, NFH, NSE y NeuN), del marcador astrocitario GFAP y de marcadores de oligodendrocitos (CNPasa) cuando se las comparaba con sus correspondientes controles. También se han realizado ensayos de diferenciación hacia células gliales periféricas con resultados prometedores (Radtke, Schmitz et al. 2009). Las hASC también han podido diferenciarse a otros derivados ectodérmicos como keratinocitos (Long, Zuk et al. 2010). En este caso, tras un cultivo de diferenciación dirigida en 3D las células obtenidas expresaban citoqueratina-8, E-cadherina y eran capaces de producir colágeno.

II.4.D. Aplicaciones clínicas de las hASC

La utilización de las ASC en terapia clínica y medicina regenerativa es muy prometedora (Strem and Hedrick 2005), por ello, la cantidad de ensayos clínicos que se están llevando a cabo con estas células mesenquimales, ha aumentado de una forma constante desde 2011. A finales de 2014, existían un total de 373 ensayos clínicos registrados en las bases de datos internacionales. (Figura 5), de los cuales, 116 correspondían a MSC y 22 se estaban llevando a cabo con hASC. En el momento del depósito de esta tesis doctoral, el número de ensayos con hASC había ascendido a 35.

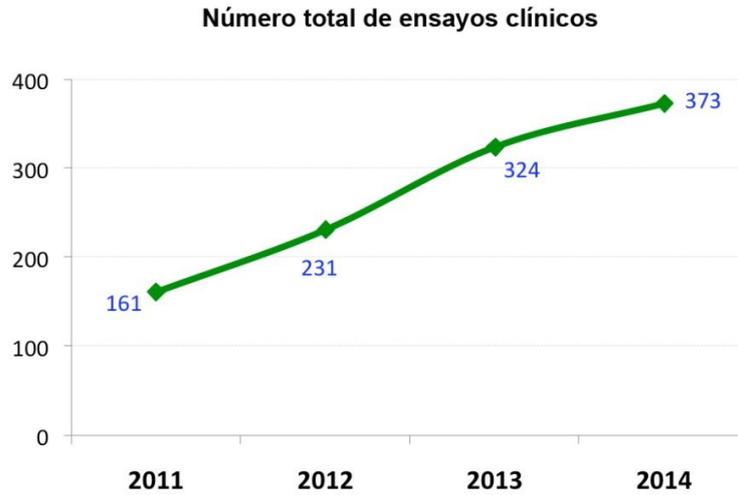


Figura 5: Nº total de ensayos clínicos de terapia celular, registrados en las bases de datos internacionales desde el 2011 a 2014. <http://celltrials.info/2015/02/14/trends-2014/> (Bersenev 2014)

Como se puede observar en la siguiente Figura, (Figura 6), las células con mayor relevancia clínica son las mesenquimales. Como puede observarse en la gráfica, los ensayos clínicos con hASC siguen aumentando cada año.

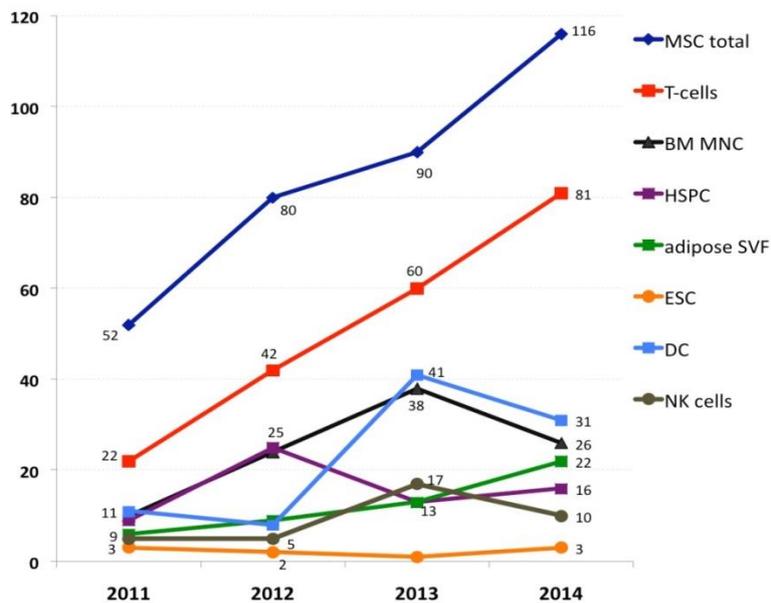


Figura 6: Evolución de los ensayos clínicos registrados en las bases de datos internacionales diferenciando entre tipos celulares desde el 2011 a 2014. <http://celltrials.info/2015/02/14/trends-2014/>. MSC: células madre mesenquimales; T-cells: células T, BM-MNC: células mononucleares de la médula ósea; HSPC: Células madre progenitoras hematopoyéticas; Adipose SVF: Fracción vascular estromal adiposa; ESC: Células madre embrionarias; DC: Células dendríticas; NK cells: Células madre Natural Killer (Bersenev 2014).

Debido a sus ventajas respecto a otras células madre, como la baja morbilidad, la fácil extracción y aislamiento, su elevada división, su capacidad de diferenciación a diferentes poblaciones celulares y la falta de componente ético, las hASC se están aplicando en diferentes campos clínicos (Strem and Hedrick 2005, Bunnell, Flaat et al. 2008).

El primer caso en el que las ASC se aplicaron fue en la reconstrucción de defectos óseos en el cráneo de una paciente de 7 años de edad después de haber sufrido un traumatismo (Lendeckel, Jodicke et al. 2004). Ésta fue tratada mediante el trasplante de hueso iliaco autólogo, suplementado con células ASC propias y fibrina, que actuaba como pegamento y como un soporte biodegradable. Las tomografías post-quirúrgicas revelaron que había nuevo hueso en formación y que casi todo el cráneo era continuo.

Posteriormente a este caso, existen gran cantidad de ensayos pre-clínicos y clínicos que utilizan las ASC como agentes terapéuticos debido a su gran relevancia en el campo de la medicina regenerativa. La búsqueda en la base de datos de "*Clinical trials*" con los parámetros: ADIPOSE + STEM + CELL reflejan una cantidad de 120 ensayos clínicos, finalizados o bien que se están llevando a cabo en estos momentos.

II.4.D.i. Utilización de las hASC en el tratamiento de la osteoartritis

La artritis degenerativa es la artritis con mayor prevalencia, y con mayor frecuencia de aparición en la población de edad avanzada, entre un 30-50%. Esta enfermedad se manifiesta mediante dolor en las articulaciones, disfunción en el movimiento debido a la pérdida del cartílago y consecuentemente, la inflamación de los tejidos adyacentes (Pulsatelli, Addimanda et al. 2013). Es una enfermedad progresiva, por lo que debido a su elevada incidencia en la población y a la ineficacia de las alternativas terapéuticas, la terapia celular parece ser una candidata muy esperanzadora (Pulsatelli, Addimanda et al. 2013). Previo a la utilización de las hASC, los modelos animales han sido una excelente manera de estudiar el comportamiento de estas células en la regeneración del cartílago. La lesión en la rodilla de un modelo de conejo, y la posterior implantación de las hASC previamente diferenciadas a cartílago, reveló la integración completa del nódulo cartilaginoso en la zona de la lesión. Además, con los análisis histológicos y moleculares se observó una producción de proteínas propias de cartílago como agregan, colágeno II y glucosaminoglicanos (Dragoo, Carlson et al. 2007). Actualmente, los ensayos clínicos que se están llevando a cabo en el campo de la regeneración del cartílago, están utilizando el trasplante autólogo, o alogénico de las hASC directamente sobre las lesiones. En total existen 16 ensayos clínicos en diferentes fases de estudio, dos de los cuales están calificados como finalizados (NCT01300598, NCT02142842).

El grupo de Jo et al, ha estudiado recientemente en pacientes con osteoartritis de rodilla, la eficacia de la inyección autóloga de sus propias hASC. El estudio se evaluó a los 6 meses después de la inyección intra-articulares de diferentes dosis de hASC mediante los resultados clínicos, radiológicos, artroscópicos e histológicos. El estudio concluyó que el tamaño de la zona con falta de cartílago disminuía conforme aumentaba la dosis de hASC

inyectadas, y que esta mejoría también se traducía en una recuperación funcional y disminución del dolor, todo ello sin la aparición de efectos adversos, ya que la inyección de hASC daba como lugar la regeneración del cartílago (Jo, Lee et al. 2014).

II.4.D.ii. Utilización de las hASC como agente cicatrizante

Las hASC tienen una elevada capacidad de cicatrización, por lo que se han utilizado en gran cantidad de terapias celulares para el tratamiento de heridas abiertas.

Actualmente existen un número de 19 ensayos clínicos que se están llevando a cabo en el campo de la cicatrización, 9 de ellos están referidos a cicatrización de fístulas relacionadas con la enfermedad de Crohn y 6 no relacionadas con esta dolencia. El resto (4) son ensayos clínicos en la cicatrización de úlceras o lesiones crónicas de la piel. En el caso de cicatrización de heridas, existen ensayos clínicos que constan como completados. Uno de ellos se inyectaban subcutáneamente hASC propias del paciente, que previamente se expandieron y se diferenciaron a adipocitos para tratar pacientes con cicatrices profundas (Kim, Kim et al. 2011). Los resultados mostraron que la media de volumen que se regeneró fue de alrededor del 76% y que en este volumen se mantuvo durante al menos 1 año. Ningún efecto adverso se encontró (NCT00992147). Desde el 2005 las hASC también están siendo aplicadas en el tratamiento de las fístulas perianales de pacientes con la enfermedad de Crohn (García-Olmo, García-Arranz et al. 2005), en los cuales las fístulas podían ser tratadas y cicatrizadas mediante la inoculación de las hASC propias del paciente. Desde entonces, existen un elevado número de ensayos clínicos que se están realizando para ayudar a la cicatrización de las fístulas en estos pacientes, asociadas o no a la enfermedad, ya que éstas tienen un gran impacto en la calidad de vida (Lee, Park et al. 2013). En estos estudios clínicos se observaba una mejoría muy significativa de pacientes tratados con sus propias hASC al tratamiento convencional de aplicación de fibrina. Incluso el gran impacto de estas células en el tratamiento de las fístulas perianales, asociadas o no al Crohn. Ha sido de tal interés que se han comercializado por la empresa *TiGenix*, existiendo en el mercado el medicamento CX601 (CX401, *Cellerix*), células alogénicas que aplicadas en los pacientes tenían un porcentaje del 56% de éxito (de la Portilla, Alba et al. 2013) (Estudios asociados a la enfermedad de Crohn: NCT01378390, NCT01372969, NCT00992485, NCT00992485, NCT00992485. Estudios no asociados a la enfermedad de Crohn: NCT00475410, NCT01020825). Este tratamiento se ha utilizado en otro tipo de fístulas, en concreto fístulas traqueales causadas por la ablación de la zona para la eliminación de las células cancerosas (Alvarez, García-Arranz et al. 2008). Otro aspecto clínico en el que las hASC han sido inoculadas, es en el tratamiento de las úlceras crónicas causadas por la radioterapia, en los que la utilización de las células mejoraron sistemáticamente las úlceras o bien remitieron (Rigotti, Marchi et al. 2007).

II.4.D.iii. Utilización de las hASC en enfermedades oculares

Las hASC son la elección más común en la terapia celular aplicada en enfermedades relacionadas con la isquemia y diabetes. La elevada cantidad de células madre autólogas extraídas a partir del tejido adiposo con capacidad de reparar tejidos vasculares y

neurrológicos, podrían tener una gran aplicación en pacientes con enfermedades retinales relacionadas o no con la diabetes, como la degeneración macular, retinitis pigmentosa, glaucoma, keratosis o retinopatías diabéticas. Todas estas enfermedades oculares cursan en los últimos estadios de la enfermedad con una ceguera irreversible por lo que se buscan nuevas estrategias que puedan disminuir las consecuencias finales de éstas. Una de las opciones que se están teniendo en cuenta es la terapia celular con hASC autólogas de los propios pacientes (Rajashekhar 2014).

Principalmente la causa común de las enfermedades oculares que cursan con ceguera irreversible es la degeneración de los capilares de la retina y posteriormente la pérdida de los pericitos, que tienen una función primordial en el mantenimiento del ambiente funcional de la retina. Estudios por parte del grupo de Rajashekhar, G en modelos animales de rata diabética, mediante la inyección intravitreal de hASC comprobaron que existía una mejoría en la función retinal. También observaron que la inyección disminuía la inflamación, la apoptosis y el edema macular (Rajashekhar, Ramadan et al. 2014).

Actualmente no existe ninguna publicación de ensayos clínicos finalizados en este campo. La búsqueda en la página web de "Clinical trials" muestra la existencia de 3 ensayos que están en la fase de reclutamiento. Los diferentes estudios que se están llevando a cabo tienen como códigos: NCT02024269, NCT0180837, NCT02144103.

Uno de ellos se está llevando a cabo en nuestro país, en el Hospital Universitario de la Paz de Madrid, cuyos pacientes están afectados por keratosis, y que están teniendo resultados esperanzadores.

II.4.D.iv. Utilización de las hASC como inmunosupresores (artritis reumatoide)

Debido a su efecto inmunosupresor *in vivo*, las hASC se utilizaron para controlar la enfermedad injerto contra huésped (Yanez, Lamana et al. 2006), debido a la inhibición de la secreción de citoquinas por parte de los linfocitos. Esta capacidad inmunosupresora e inmunomoduladora también se está aplicando en el tratamiento de enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio. Un ejemplo de esta aplicación son los estudios realizados *in vitro* en el tratamiento de la artritis reumatoide, una enfermedad que afecta a las articulaciones y que cursa con inflamación de éstas (Gonzalez-Rey, Gonzalez et al. 2010). La empresa *TiGenix* ha comercializado estas células para el tratamiento de esta enfermedad (NCT01663116). En el ensayo clínico se evaluó la seguridad, la tolerabilidad y la dosificación óptima a lo largo de los 6 meses de duración del ensayo, así como explorar la actividad terapéutica mediante la inyección intravenosa de hASC alogénicas. Los resultados que se obtuvieron fueron beneficiosos para el tratamiento de la artritis reumatoide.

II.4.D.v. Utilización de las hASC en reparación cardiovascular

Las hASC están siendo objeto de estudio como una estrategia terapéutica en las enfermedades cardiovasculares, mediante la inyección celular en el tratamiento del infarto agudo de miocardio (Naaijkens, van Dijk et al. 2014, Perin, Sanz-Ruiz et al. 2014).

En 2009 se publicó un estudio de terapia celular en el tratamiento del infarto de miocardio en un modelo de rata, en el que la inyección de hASC, previamente marcadas con GFP en un corazón isquémico, resultaba en la mejoría de la función cardíaca, aunque los resultados eran algo paradójicos, ya que el porcentaje de injerto de las células en el corazón trasplantado no era muy elevado (Schenke-Layland, Strem et al. 2009).

La búsqueda de ensayos clínicos en la página de "Clinical trial" dio como resultado 13 ensayos clínicos en diferentes fases de estudio, 4 de los cuales calificados como completos: NCT00442806, NCT01449032, NCT00426868, NCT00426868, en los que se realizaban inyecciones directas en el lugar del infarto de las hASC. Sin embargo no hemos encontrado ninguna publicación. Tres de los cuales están esponsorizados por la empresa *Cytori Therapeutics*.

II.4.D.vi. Utilización de las hASC en el tratamiento de isquemia de miembros inferiores

El aumento de la neovascularización es una de las estrategias que se deben tener en cuenta en los daños postisquémicos, por lo tanto se puede aplicar las hASC ayudar a la neovascularización. La isquemia de los miembros inferiores está asociada a elevados porcentajes de mortalidad y amputación a pesar de los tratamientos que se aplican. Uno de los modelos en los que se ha aplicado es el modelo isquémico de miembros inferiores en ratón. La inyección de las hASC permite la revascularización del miembro infartado. Mediante ecografía Doppler se observó que existía un aumento del flujo sanguíneo después de la inyección de las hASC. Además, mediante examen histológico se vio que las ASC inyectadas se incorporaban a los vasos sanguíneos dentro del sistema vascular del ratón (Cao, Sun et al. 2005). Otros estudios utilizando el mismo modelo y las hASC mediante microangiografías corroboraron la mejoría del músculo isquémico. En este caso el cultivo de las hASC se realizó sobre matrigel, en el que se pudieron observar estructuras tubulares conteniendo eritrocitos en el lumen de estas estructuras cuando las hASC eran introducidas en la zona de lesión (Planat-Benard, Silvestre et al. 2004)El estudio en modelos animales ha permitido continuar el estudio de la utilización de las hASC en ensayos clínicos con pacientes humanos. Hoy en día existen 8 ensayos clínicos en pacientes de los cuales dos constan como finalizados (NCT02145897, NCT01211028)

II.4.D.vii. Utilización de las hASC en daños neurológicos

La terapia de inyección de hASC ha sido aplicada en tratamientos relacionados con el sistema nervioso. Un modelo donde se ha aplicado esta técnica es el modelo de daño traumático cerebral, en que se observaron que después de la inyección los daños neurológicos no eran tan severos como en los casos control. Además el volumen de la lesión era significativamente menor en los casos tratados y por último, que las reacciones de inflamación y astrogliosis se reducían en el trasplante (Xue, Zhang et al. 2010)

Las hASC también han sido trasplantadas en modelos de isquemia en ratas. Previamente se pre-diferenciaban *in vitro* a células neurales y se trasplantaban en el ventrículo lateral de ratas que habían sufrido la oclusión de la arteria cerebral media. Se observó que las células trasplantadas sobrevivían hasta 30 días después de la inyección, podían migrar a la zona infartada, concretamente se situaban en la zona de penumbra. Finalmente, utilizaban las hASC como vehículo de transferencia génica con fines terapéuticos, en el que inyectaban hASC transfectadas con el gen del BDNF. El análisis funcional de estos ensayos revelaron que había una mejora significativa del comportamiento motor y somatosensorial en ambos casos, pero esta mejoría era mayor en los casos de las células transfectadas (Kang, Lee et al. 2003).

Por otro lado y siguiendo la misma línea de investigación en el sistema nervioso, la terapia celular está siendo estudiada en el tratamiento de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, como es el caso de la enfermedad de Niemann-Pick, en la que existe un déficit de la enzima esfingomielasa resultando en una acumulación de esfingolípidos y colesterol en los lisosomas celulares. La consecuencia de estos depósitos es una grave neurodegeneración. En 2010, se publicó un estudio en el que un modelo murino para esta enfermedad, la inyección intracerebelar de ASC de ratón producía una disminución significativa de la pérdida de neuronas de Purkinje, la activación glial se suprimía y mejoraba la función cerebelar (Bae, Carter et al. 2010).

La búsqueda en la página de "*Clinical trials*", refleja la existencia de diferentes ensayos clínicos referidos a daños neurológicos o patologías relacionadas con el sistema nervioso: en el tratamiento de daños en la médula espinal (ensayo completado: NCT01274975), en esclerosis múltiple, en enfermedad de Parkinson, en ataxia cerebelar, en esquizofrenia, en isquemia cerebral o daños cerebrales (ensayo completo: NCT01649700).

II.4.D.viii. Utilización de las hASC en cirugía reconstructiva

En la sociedad actual tanto la cirugía reconstructiva y la estética son campos de la medicina cuyo auge aumenta de manera exponencial. Existen estudios en este respecto en los que la inyección de grasa aspirada está considerada como una buena alternativa para el aumento de tejidos blandos, como es el caso del pecho. Con este método de trasplante de grasa autóloga, se evita la existencia de cicatriz debido a la cirugía y las complicaciones postquirúrgicas debido a la utilización de materiales extraños (Matsumoto, Sato et al. 2006).

La mastectomía es uno de los tratamientos más drásticos frente al cáncer de mama. Existen diferentes publicaciones sobre cirugía reconstructiva en los que la inyección de grasa

autóloga se aplica para minimizar los efectos negativos de los tratamientos radiológicos sobre los implantes (Salgarello, Visconti et al. 2010).

La búsqueda de ensayos clínicos en la página de "*Clinical trial*", encontramos diferentes ensayos en diversas fases de estudio, en los que se pretende aplicar o en su caso, se aplica la administración de ASC para la reparación de la mama después de sufrir mastectomías. Constan como completos, los siguientes ensayos: NCT00616135 y NCT02035085.

Por otro lado no sólo se aplica en cirugía reconstructiva de pecho, sino también en la reparación de defectos faciales, como labio leporino (Balkin, Samra et al. 2014), para favorecer la cicatrización.

La búsqueda en la página de "*Clinical trial*" también muestra la aplicación de las hASC en el tratamiento de la enfermedad de Romberg, que cursa con una atrofia de los tejidos blandos y óseos craneofaciales (NCT01309061) (Koh, Oh et al. 2012). Los resultados de la aplicación de las hASC en el tratamiento, fueron positivos, ya que éstas favorecían la supervivencia de los injertos de grasa en los pacientes, frente aquellos que únicamente se aplicaba el injerto.

Otros tipos de ensayos clínicos en los que se aplica la terapia celular con las ASC, que cabe destacar es la administración intravenosa de las células en enfermos de diabetes tipo 1 y 2 o la aplicación en patologías pulmonares como la fibrosis pulmonar o la enfermedad crónica pulmonar obstructiva entre otros o bien en el tratamiento de la incontinencia urinaria, con un ensayos en fase dos completado (NCT01799694).

Mostramos una recopilación de los ensayos clínicos que se están llevando a cabo utilizando las hASC en la Tabla 1 del Anexo.

II.4.E. Necesidad de la adaptación de metodologías de cultivo de las para su uso en terapia celular

Los protocolos de expansión celular empleados hasta el momento de realización de esta tesis doctoral empleaban componentes de origen animal con el consecuente riesgo de transmisión de infecciones por patógenos no humanos (Martin, Muotri et al. 2005, Mannello and Tonti 2007). De hecho muchos de los ensayos clínicos resumidos en las tabla 1 (en el Anexo), especialmente aquellos que han necesitado de un expansión celular previa en el laboratorio, han sido realizados empleando estos reactivos, tras someterlos a aprobación por los organismos reguladores competentes. Los componentes animales utilizados mayoritariamente son: el suero bovino fetal (FBS) como suplemento en el medio de cultivo para mantener las células antes del tratamiento, la albúmina de suero bovino (BSA), utilizada como agente para el lavado celular o la tripsina, procedente del cerdo, que se emplea para expandir las células durante el cultivo (Heiskanen, Satomaa et al. 2007). Sin embargo, la utilización de compuestos xenogénicos conlleva un riesgo elevado de transmisión agentes infecciosos, como bacterias, virus o priones (Erickson, Bolin et al. 1991, Bihl and Negro 2010, Knight 2010). Muchas veces, el uso de FBS durante el cultivo y expansión celular previa a la infusión celular, desencadena la producción de anticuerpos

contra el suero bovino en el paciente tratado provocando el rechazo (Selvaggi, Walker et al. 1997, Mackensen, Drager et al. 2000, Sundin, Ringden et al. 2007).

Otras veces, el uso de reactivos de origen animal provoca riesgos de transmisión de patógenos animales a los cultivos humanos obtenidos, fenómeno denominado zoonosis (Langat and Mwenda 2000). El caso más claro registrado hasta el momento, es la capacidad de transmisión de la encefalopatía espongiforme bovina a la especie humana. Esta posibilidad dio la voz de alarma sobre el uso de derivados de FBS en los medios de cultivo. Este riesgo se intentó solucionar empleando FBS obtenido a partir de vacas de Nueva Zelanda, que son las únicas que no se han visto afectadas por la enfermedad hasta el momento. Pero este problema no es un hecho aislado. Durante un estudio llevado a cabo en 2005, se detectó que algunas líneas de hESC, expresaban un derivado del ácido siálico denominado Neu5Gc. Esta molécula es característica en ratones pero nuestra especie perdió la capacidad de producirla durante la evolución. Los experimentos llevados a cabo permitieron demostrar que las células humanas habían adquirido la capacidad de sintetizarla tras su cultivo sobre feeder layers de ratón (Martin, Muotri et al. 2005). Las repercusiones que esto pudiera tener en la especie humana, en caso de ser adquirido a través de un trasplante celular, todavía no se conocen.

La posibilidad de emplear las hASC en procedimientos con fines terapéuticos e ingeniería de tejidos hace necesario que el control de los parámetros para realizar el aislamiento y cultivo celular de las mismas sea mucho más estricto. Por ello, una de las medidas más demandadas durante los últimos años ha sido la necesidad de adaptar los protocolos de aislamiento y cultivo eliminando los reactivos de origen animal. Por ello, varios grupos están trabajando para conseguir este objetivo. Bieback, cultivó BM-MSC empleando distintas alternativas, como el suero humano grupo AB, lisados plaquetarios. Sus experimentos demostraron que la utilización de estos derivados humanos favorecía el crecimiento de las células mesenquimales, manteniendo sus características (Bieback, Hecker et al. 2009)

Aun así, durante el protocolo de extracción y mantenimiento de las MSCs, este grupo siguió empleando otros reactivos de origen animal como BSA o tripsina. Por eso el principal objetivo de esta tesis doctoral era ir un paso más allá intentando crear un protocolo libre de reactivos animales..

II.5. HETEROGENEIDAD DE LA SVF: CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS POBLACIONES CELULARES PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE hASC.

II.5.A. Expresión de genes de desarrollo temprano en MSCs: Muse cells

Las MSCs son una población celular muy heterogénea. Diversos estudios han sugerido que esta amalgama celular podría contener incluso una pequeña fracción de células parecidas a las pluripotentes. Estas células serían capaces de diferenciarse a tejidos de las tres hojas embrionarias y estarían encargadas de participar en procesos de regeneración complejos (Wakao, Akashi et al. 2014). La expresión de factores de transcripción y marcadores de desarrollo temprano característicos de células madre pluripotentes humanas (OCT3/4, Nanog, SSEA4 O TRA 1-81) ha sido descrita en MSCs con diferentes orígenes (placenta, ligamento periodontal o médula ósea), sometidas a condiciones especiales de cultivo (Battula, Bareiss et al. 2007, Battula, Trembl et al. 2008, Trubiani, Zalzal et al. 2010). En su artículo de 2007, Battula y colaboradores incluso demuestran la capacidad de las células mesenquimales de placenta para diferenciar a ectodermo, mesodermo y endodermo, aunque no llegan a demostrar la funcionalidad de las células obtenidas. Otros autores, han reportado que MSC que sobre-expresaban Nanog y Oct-3/4, tenían una tasa de proliferación más elevada (Liu, Wu et al. 2009).

En el año 2010, científicos japoneses dieron a conocer la existencia de una subpoblación celular presente en las MSCs que podían encontrarse en el tejido conectivo de la médula ósea, dermis o tejido adiposo humano. Estas células se conocen con el nombre de Muse (del inglés: “Multilineage differentiating stress-enduring”) y presentan las siguientes características (Wakao, Kitada et al. 2011): I) las células Muse comparten todas las características de las MSCs pero son además pluripotenciales, siendo capaces de diferenciar dando lugar a derivados de ectodermo, mesodermo y endodermo (Wakao, Kitada et al. 2011), II) expresan marcadores característicos de células mesenquimales (CD105, CD90 y CD29), pluripotentes (SSEA-3), III) son capaces de formar clusters en suspensión positivos para Nanog, Oct $\frac{3}{4}$ y Sox2, marcadores característicos de hESC, IV) son doblemente positivas para SSEA-3 y CD105, lo que permite aislarlas por FACS, V) presentan baja actividad telomerasa y no inducen tumores. VI) Son una población heterogénea. Las células Muse aisladas a partir de BM contienen fibroblastos y 0.03% de células mononucleadas. VII) Su ratio de proliferación es de 1.3 días por división celular. Y por último, VIII) pueden llevar a cabo procesos de reparación *in vivo* (Wakao, Kitada et al. 2011).

II.5.B. Side population (SP)

II.5.B.i. Proteína receptora del cáncer de mama

La SP, fue aislada por primera vez por el grupo de Margaret Goodell a partir de médula ósea de ratón. Se define como una subpoblación celular que posee características propias de las células madre, las cuales pueden ser aisladas mediante su propiedad de expulsar sustratos

lipofílicos como el agente de unión al ADN, Hoescht 33342 (Goodell, Brose et al. 1996). Estas células muestran: I) expresión reducida de los marcadores de diferenciación, II) elevada tasa proliferativa en cultivo celular, III) capacidad de autorrenovación *in vitro* IV) aumento de su capacidad migratoria mediante la formación de lamelipodios y V) capacidad de producir tumores (Kato, Takao et al. 2010). Además de poder ser aisladas a partir de tumores, o líneas de células cancerosas (Hirschmann-Jax, Foster et al. 2004), también pueden ser aisladas a partir de tejidos sanos como glándula mamaria (Alvi, Clayton et al. 2003), próstata (Bhatt, Brown et al. 2003), retina (Bhattacharya, Jackson et al. 2003), hígado (Hussain, Strom et al. 2005), pulmón (Summer, Kotton et al. 2003) y testículos entre otros. Las células SP aisladas de la médula ósea están enriquecidas en células hematopoyéticas que pueden repoblar las células sanguíneas (Asakura and Rudnicki 2002) y también pueden contribuir a la regeneración del músculo esquelético (Goodell, Brose et al. 1996, Camargo, Green et al. 2003, Camargo, Chambers et al. 2004).

La SP tiene gran potencial de diferenciación hacia mesodermo y ectodermo, por lo que muchos autores proponen que la expresión del transportador podría considerarse como un marcador universal de célula madre (Alvi, Clayton et al. 2003).

El grupo del Dr. Izadyar identificó la subpoblación SP en la SVF obtenida del tejido adiposo. El porcentaje de células capaces de expulsar las sustancias lipofílicas era de un 2.5 %. También observaron que las células obtenidas tenían un gran potencial para diferenciarse a condrocitos, osteocitos y adipocitos. Además, al inyectarlas en un modelo de cicatrización, observaron la restauración normal de la citoarquitectura de la piel dañada (Ramos, Wang et al. 2009). Estudios de ciclo celular llevados a cabo por el mismo grupo sugirieron, que las células SP permanecen en un estado quiescente en fase G1 y parece posible que se mantengan en este estado aguardando a responder a un daño traumático, para generar más adipocitos (Ramos, Wang et al. 2009) Experimentos llevados a cabo por otro grupo de investigación, parecen indicar que la población SP hallada en la SVF es además CD34⁺ (De Francesco, Tirino et al. 2009). Otros ensayos demostraron que las células SP aisladas a partir de músculo esquelético satélite eran mediante un trasplante intravenoso podían reconstituir la hematopoyesis (Jackson, Mi et al. 1999). La plasticidad de las células SP las convierte en un tipo celular muy atractivo para su estudio.

II.5.B.ii. ABCG2 como proteína identificadora de SP

El fenotipo SP se sugirió como resultado de la presencia de una proteína transportadora de membrana que eran inhibida por el verapamilo (Goodell, Brose et al. 1996). La adición de verapamilo disminuía el transporte del Hoescht33342 hacia el exterior celular, confirmando la especificidad de la tinción y sugiriendo que el fenotipo de SP, por eliminación del Hoescht33342 en células madre hematopoyéticas (HSC), está mediado por el transportador ABC (Bunting 2002)

Ramos y cols encontraron que la SP aislada a partir de tejido adiposo de ratón y que tenía un elevado potencial de diferenciación, eliminaban efectivamente el Hoescht33342, presumiblemente debido a la existencia del transportador ABC (Ramos, Wang et al. 2009). Los estudios realizados por el Dr. AJ. Alvi en células epiteliales mamarias humanas y murinas, revelaron que cuando aislaban la SP, ésta expresaba marcadores de relativa

indiferenciación. Además la fracción SP estaba enriquecida en células que expresaban ABCG2 y la subunidad catalítica de la enzima telomerasa (TERT) (Alvi, Clayton et al. 2003).

La proteína ABCG2 se expresa en una gran variedad de células madre, siendo determinante indispensable del fenotipo SP (Zhou, Schuetz et al. 2001). Zhou y cols observaron que la disminución de la expresión del ABCG2 en los estadios de compromiso celular en las células embrionarias, sugiere que la proteína transportadora tiene un papel crucial en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células (Zhou, Schuetz et al. 2001). Además otros estudios han confirmado su papel como identificador de células madre. A partir de células progenitoras de ratones knock-out para el ABCG2 se vio que la capacidad de formar colonias estaba muy disminuida cuando éstas eran cultivadas en un ambiente hipóxico (Krishnamurthy, Ross et al. 2004). La razón se debía a la acumulación de metabolitos tóxicos tipo hemo en el citoplasma, por lo tanto la expresión de ABCG2 tiene una función protectora aumentando la supervivencia de las células madre y reduciendo la acumulación de metabolitos tóxicos (Krishnamurthy, Ross et al. 2004).

El ABCG2 también se ha encontrado en poblaciones de células madre y progenitoras. Parece que su misión sería protegerlas de la acción de xenobióticos tóxicos o carcinogénicos (van Herwaarden and Schinkel 2006)

II.5.C. Antígeno embrionario específico de estadio “Stage Specific Antigen 1” (SSEA1)

El llamado Stage-Specific Embryonic Antigen-1 o SSEA1 o antígeno de Lewis X (Lex-1), es un trisacárido 3-fucosil-N-acetil-lactosamina localizado en la membrana plasmática. Pertenece a los antígenos de cluster de diferenciación (CD) (también denominado CD15) y que se expresa durante la diferenciación neural de las células embrionarias neurales (Pruszk, Sonntag et al. 2007). También está considerado marcador de células embrionarias de ratón y BM-MSC (Lin, Garcia et al. 2008). También se ha visto que existe expresión en células de carcinoma tanto de humanos como de ratones y en células germinales primordiales, incluso su expresión puede prolongarse en el caso del sistema nervioso central desde el desarrollo hasta la edad adulta. En el ratón adulto, SSEA1 es expresado en poblaciones de astrocitos, tanicito y en algunos casos en neuronas (Kucia, Zuba-Surma et al. 2007) o también en zonas neurogénicas como la SVZ y el giro dentado, donde la expresión de SSEA1 es muy elevada (Capela and Temple 2002). Se ha descrito que la expresión de esta proteína en el sistema nervioso central de ratón no está limitada a los nichos neurogénicos sino que también se podía encontrar expresión de SSEA1 en el camino migratorio rostral, en los bulbos olfatorios, en el cuerpo caloso o en el córtex, pero ésta era considerablemente más débil (Capela and Temple 2002). El mismo grupo observó que mediante la purificación de células que expresaban SSEA1⁺ a partir de la SVZ, la capacidad de generar neuroesferas era mucho mayor, mientras que las SSEA1⁻ carecían de esta capacidad.

Con respecto a la expresión en tejidos adultos, existe cierta controversia. Algunos grupos piensan que la expresión de SSEA1 solo se da en células neuroepiteliales inmaduras. A este respecto, se encontró que SSEA-1 aparecía sobreexpresada en células embrionarias neuroepiteliales que además eran Sox-1⁺, Sox-2⁺ (Pruszk, Ludwig et al. 2009), pero no en

neuronas dopaminérgicas. La co-expresión de SSEA-1 y Oct $\frac{3}{4}$ también ha sido observada en mESC (Rhee and Bao 2009) pero no en hESC.

El hecho de que SSEA-1 sea expresado en células madre pluripotentes o en células madre del sistema nervioso adulto sugiere que juega un papel muy importante para el funcionamiento celular (Capela and Temple 2002). Por ello, SSEA-1 y CD133 se consideran marcadores de células madre neurales (Kucia, Zuba-Surma et al. 2007).

El grupo de la Dra. TA. Read utilizando un modelo de ratón de meduloblastoma sugirió que el SSEA1 podría ser considerado como un marcador de las células tumorales. Los ensayos que se llevaron a cabo permitieron, observar que todos los tumores tenían en común la expresión de 3 genes. De estos tres, sólo las células SSEA1⁺ daban lugar a tumores cuando eran inyectadas en ratones inmunodeprimidos, sugiriendo que las células SSEA-1⁺ eran las responsables de la generación de los tumores (Read, Fogarty et al. 2009).

Estudios de perfiles moleculares llevados a cabo comparando la subpoblación SSEA1⁺ y SSEA1⁻ de meduloblastoma de ratón permitieron identificar 5 bloques de genes que estaban diferencialmente expresados: reguladores de la proliferación y el mantenimiento celular (sobre-expresados en las células SSEA-1⁺); pro-apoptóticos (regulados a la baja en estas mismas células y sobre-expresados en las células SSEA-1⁻) y anti-apoptóticos (que tenían una expresión muy alta en células SSEA-1⁺). Los genes implicados en la migración celular y crecimiento de axones estaban regulados a la baja en la población SSEA1⁺. Todo ello sugería que la que la capacidad de migración de los tumores SSEA1⁺ estaba asociada a un incremento en la capacidad de la proliferación celular y a una disminución de la actividad apoptótica y de diferenciación (Read, Fogarty et al. 2009).

Análisis realizados en meduloblastoma humano identificaron que existía expresión de SSEA1 y que éste se expresaba en la mayoría de estos tejidos tumorales. Además, la presencia del antígeno se correlacionaba con la supervivencia de los pacientes, por lo que se ha sugerido el uso de este marcador como una herramienta para evaluar la prognosis del meduloblastoma humano (Read, Fogarty et al. 2009).

En BM-MSK se han identificado también células SSEA1⁺. Estas células co-expresan marcadores de indiferenciación temprana como el Oct $\frac{3}{4}$, Nanog y Rex-1. (Anjos-Afonso and Bonnet 2007). Su aparición parece ser dependiente de la edad. Por otro lado también se estudió su capacidad de diferenciación dirigida hacia hueso, grasa, musculo, células hepáticas y hacia neuroectodermo, detectándose marcadores positivos para todas ellas. (Anjos-Afonso and Bonnet 2007).

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

III.1. OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Diseño de un procedimiento de aislamiento y cultivo de hASC evitando el uso de reactivos de origen animal, para facilitar usos posteriores de las células obtenidas en procedimientos de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa.
2. Evaluación de la capacidad multipotente de las células obtenidas por el procedimiento diseñado en nuestro laboratorio a diferentes linajes y su posterior caracterización.
3. Estudio de las distintas subpoblaciones celulares presentes en las hASC obtenidas a partir de nuestro método. Identificación, aislamiento y caracterización.

III.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Mejorar el procedimiento de aislamiento y cultivo sin alterar las capacidades propias de las hASC.
2. Análisis mediante la utilización de la tecnología microarray de las hASC durante los pases establecidos en el crecimiento celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y METODOS

IV.1. PARTE 1-DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE LA SVF SIN COMPONENTES DE ORIGEN ANIMAL

IV.1.A. Origen de las muestras y consentimiento informado

Las muestras de tejido adiposo humano utilizadas en esta tesis doctoral (n= 15), se obtuvieron en la Clínica de cirugía estética y reparativa de la doctora Isabel Moreno, tras la firma del correspondiente consentimiento informado (Ver en Anexo 2). Dichas muestras provenían de lipoaspirados (LPA) de donantes sanos de ambos sexos con edades comprendidas entre 18 a 35 años, que se sometían al proceso quirúrgico por razones estéticas. El procesado de las mismas se realizó en el Centro de Investigación Príncipe Felipe bajo el consiguiente informe y aprobación del proyecto por los comités de Ética e Investigación del citado centro. Todos los donantes fueron sometidos a análisis de sangre previos para descartar enfermedades como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis C y otras enfermedades infecciosas. Una vez recogidas, las muestras se trasladaron al laboratorio manteniendo las condiciones de asepsia y esterilidad. Para proceder al aislamiento de la SVF, el volumen total de lipoaspirado se separó en dos partes iguales, vertiéndolo en recipientes estériles.

IV.1.B. Recolección y almacenaje de suero humano

El suero humano (HS) (del inglés Human Serum) del grupo sanguíneo AB se obtuvo a partir de donantes de sangre en el Centro Regional de Transfusiones de Valencia, tras descartar la presencia de enfermedades infecciosas. Los distintos lotes se crearon agrupando muestras de 80-100 donantes y centrifugando el suero en una ultracentrífuga a 2900 g durante 10 minutos y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

IV.1.C. Aislamiento de las hASC empleando un método clásico

Siguiendo el protocolo descrito por Zuk y cols en 2001 con modificaciones. Los LPA se lavaron con PBS para eliminar posibles restos sanguíneos y se sometieron a una digestión con 0.075% de colagenasa tipo I en PBS durante 1h a 37°C en agitación. Finalizada la digestión, la muestra se centrifugó durante 10 min a 700 rpm. El pellet celular obtenido fue incubado en 160 mM NH₄Cl durante 20 min a temperatura ambiente para proceder a la lisis de los eritrocitos presentes en la muestra. Posteriormente el tampón de lisis se eliminó por centrifugación, resuspendiendo el pellet en HBSS. A continuación se procedió a realizar un filtrado decreciente de la muestra para aislar la SVF empleando filtros de nylon de diámetro de poro 100 µm, 70 µm y 40 µm sucesivamente. Finalmente, el pellet celular obtenido se centrifugó y las células se sembraron en DMEM suplementado con 10% de FBS y 0.5% de Penicilina/Estreptomina (P/S). Tras la siembra, los cultivos se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia.

IV.1.D. Aislamiento de las hASC mediante nuestro método

Tras la recogida de muestras, se procedió a su digestión con Colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) (1 mg/mL en HBSS ^{-Ca} ^{-Mg}) suplementada con DNasa (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10mg/mL durante 90 min a 37°C. Después de centrifugarlas a 450g durante 7 minutos, se descartó la fracción sobrenadante, que contenía el líquido de infiltración empleado durante la intervención, adipocitos y restos de sangre. Posteriormente, las células se lavaron y centrifugaron dos veces con 0.5% de albúmina de suero humano (HSA, "del inglés Human Serum Albumin") en HBSS ^{+Ca} ^{+Mg}.

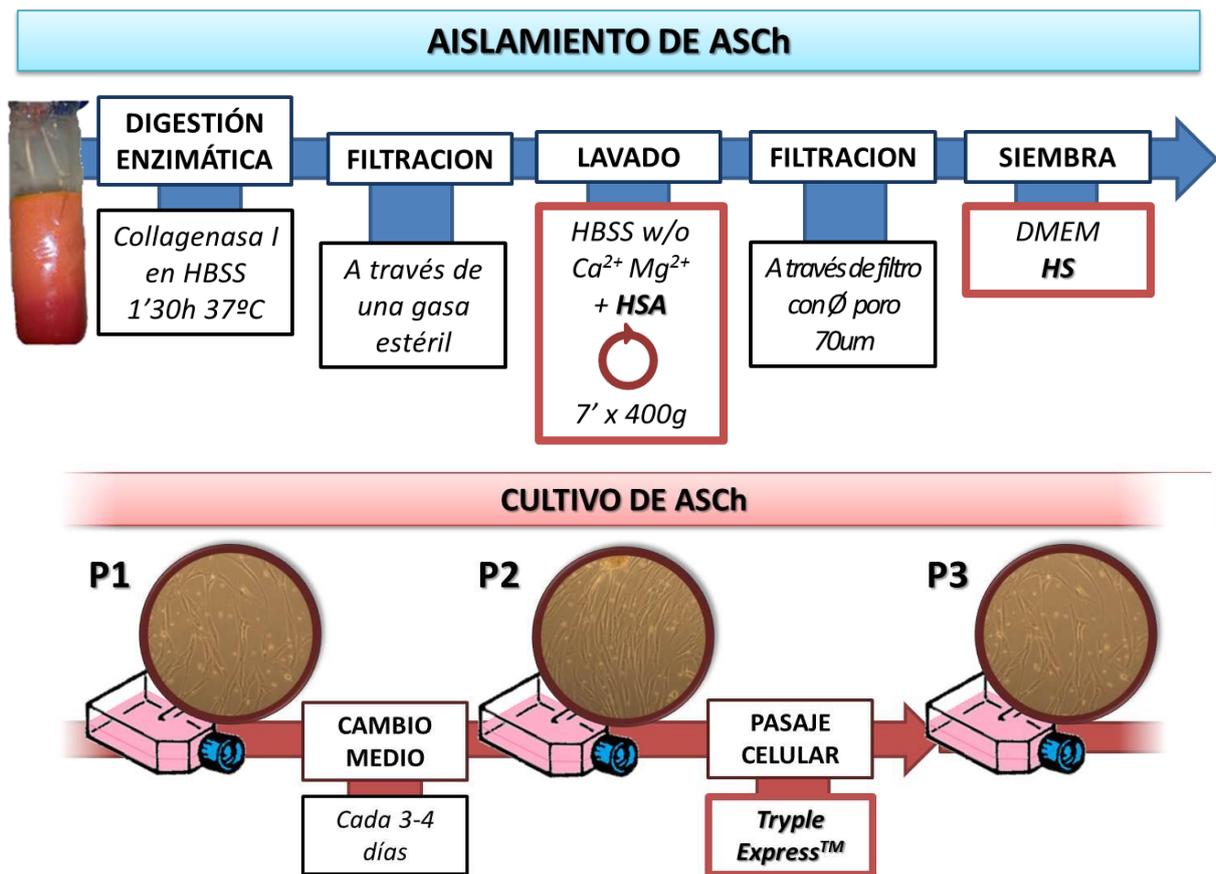


Figura. 7: Diseño experimental del aislamiento y cultivo de las hASC. Las adaptaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral se muestran encuadradas en rojo.

Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 0.5% de HSA en HBSS ^{+Ca} ^{+Mg} y se filtró empleando un filtro de nylon de 100 mm de diámetro (Falcon). La muestra filtrada se centrifugó por último obteniendo la SVF. El pellet de hASC obtenidas se dividió en 3 partes. Dos de ellas se destinaron para llevar a cabo los análisis celulares y moleculares pertinentes y con la tercera se estableció el cultivo celular.

Para la elaboración del medio de cultivo de células mesenquimales (posteriormente también llamado Medio control (MC)), se empleó Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 6% HS y 0.5% de Penicilina/Estreptomicina (P/S). Todos los reactivos de cultivo empleados se compraron en Life Technologies. Tras su siembra, las células se

mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. Este medio es referido en este trabajo de investigación como medio de mesenquimales o medio control. La Figura 7 resume el proceso de aislamiento y cultivo de las hASC desarrollado por nuestro grupo.

IV.1.E. Tampón de lisis de eritrocitos

El tampón de lisis de eritrocitos utilizado durante la extracción de las hASC se preparó siguiendo las instrucciones previamente descritas ZUK (Zuk, Zhu et al. 2002). Consistía en una solución 10X a base de NH₄Cl al 1.5M, NaHCO₃ al 0.1M y EDTA 1mM en agua con un pH de 7.4.

IV.1.F. Mantenimiento en cultivo y expansión celular

Transcurridas 48 horas tras la siembra, los cultivos se observaron y fotografiaron para documentar su aspecto, realizando el cambio del medio de cultivo celular. La composición de dichos medios de cultivo se describe en el apartado III. 1. D.

Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar un 80% de confluencia, momento en el que se procedió a la expansión celular mediante incubación con Triplex® (Gibco) durante 5 minutos a 37°C. Tras los sucesivos lavados y centrifugaciones, la resiembra celular se llevó a cabo a razón de 1:3 empleando frascos de cultivo de T75 (Corning).

Los cultivos fueron analizados para descartar la presencia de infección por micoplasma de forma rutinaria mediante el kit comercial Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC), siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV.1.G. Estudio de la proliferación celular

Con el fin de determinar la capacidad proliferativa de las hASC, se llevaron a cabo cultivos paralelos de tres donantes durante 11 pases utilizando dos condiciones de cultivo, medio diseñado en nuestro laboratorio (con el 6% de SH) y el medio clásico (con 10% de FBS). Los pases se realizaron cada 4 días para continuar el mantenimiento de los cultivos. En cada pase, la tasa del crecimiento celular se determinó utilizando la fórmula: $x = \frac{\log_{10}(N_{11}) - \log_{10}(N_1)}{\log_{10}(2)}$, donde N_1 era el n° de células sembradas y N_{11} las células recogidas en cada pase. La tasa de crecimiento celular acumulada se calculó mediante la adición a cada pase la tasa anterior. Paralelamente se calculó la curva de crecimiento comenzando en el P3, sembrándose 200 células/cm² en placas de 24 pocillos (Beckton Dickinson). Cada día se levantaban las células de 2 pocillos y se contaban.

IV.1.H. Análisis de expresión de marcadores de superficie

IV.1.H.i. Citometría de flujo

Las hASC (desde pase 1 a 5) se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² a una densidad de 2000 células/cm². Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células fueron levantadas con Triplex® y centrifugadas a durante 7 minutos a 400g. A continuación se lavaron 3 veces con HBSS con 0.5% de HSA para minimizar la agresividad del tratamiento, centrifugándose en las condiciones anteriormente mencionadas.

El sedimento celular se resuspendió en 1ml de PBS y se distribuyó en alícuotas de 100.000 células en tubos de citometría centrifugándolos durante 5 min. a 400 g. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100 µL de tampón de bloqueo (HBSS con 1% HSA) durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaron a 450g durante 7 min, se resuspendieron en el tampón bloqueo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos y los isótipos correspondientes (ver tabla 2). Tras la incubación, se añadieron 3 mL de PBS, se centrifugaron a 450 g durante 7 min y se resuspendieron en 500 µL de PBS para su análisis en el citómetro de flujo Cytomics FC 500 de Beckmann Coulter SA.

Tabla 2: Anticuerpos y diluciones de trabajo utilizados para la caracterización fenotípica de las hASC mediante citometría de flujo.

Anticuerpo	Isotipo	Uso	Casa comercial	Nº de catálogo
CD14-PE	IgG1	10 µL/test	R&D	FAB3832P
CD144-PE	IgG2 _β	10 µL/test	R&D	FAB9381P
CD146-PE	IgG1	10 µL/test	R&D	FAB932P
CD166-PE	IgG1	10 µL/test	R&D	FAB6561P
CD73-PE	IgG1K	20 µL/test	BD	550257
CD90-PE	IgG1	20 µL/test	Beckman Coulter	IM1840U
CD44-APC	IgG2 _β K	10 µL/test	BD	559942
CD45-APC	IgG1	10 µL/test	R&D	FAB1430A
CD117-APC	IgG1	10 µL/test	R&D	FAB332A
Isotipo IgG1-PE	IgG1	10 µL/test	R&D	FAB6561P
Isotipo IgG2 _β -PE	IgG2 _β	10 µL/test	R&D	550257
Isotipo IgG2 _β K -APC	IgG2 _β K	10 µL/test	BD	IM1840U
Isotipo IgG1-APC	IgG1	10 µL/test	R&D	FAB9381P

La población celular se acotó para poder detectar un mínimo de 10.000 eventos excluyendo los dobletes. Para establecer los límites para aceptar la señal como positiva, los eventos con valores menores de 0.5% se consideraron negativos

Así mismo, se analizó la población celular sin ningún tipo de marcaje, para comprobar la posible autofluorescencia de las células y corroborar que el marcaje no alteraba su complejidad y morfología.

IV.1.H.ii. Inmunocitoquímica.

Con el fin de llevar a cabo esta inmunocitoquímica, las células se sembraron en cubreobjetos especiales de Permanox (Falcon) aptos para cultivo celular, a razón de 2000 células/cm². Las células se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia, momento en el cual fueron fijadas con 4% de paraformaldehído en PBS, overnight a 4°C. Tras la fijación, las cámaras de cultivo se lavaron 3 veces con abundante PBS para eliminar las trazas de fijador y se guardaron en nevera hasta proceder a su tinción.

Para la inmunocitoquímica de fluorescencia en primer lugar las muestras se lavaron 3 veces con PBS con 0,01% Tritón X-100 (Panreac) y se bloquearon con PBS, 10% suero de cabra recién nacida (Newborn Goat Serum, NGS, Gibco-Invitrogen) y 0,01% Triton X-100 durante 1 hora a 37°C.

A continuación se incubó con los anticuerpos primarios durante 1 hora a 37°C. Como anticuerpos primarios se usaron: conejo anti-GFAP (5 µg/ml Chemicon-Millipore, Madrid), ratón anti MAP2 (5 µg/ml Chemicon-Millipore, Madrid). Se añadieron 35 µL de solución de anticuerpo a cada una de las muestras.

Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min. con PBS y se incubó con los anticuerpos secundarios (dilución 1:600 en tampón bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Como anticuerpos secundarios se utilizaron Alexa Fluor 555 cabra anti conejo y Alexa Fluor 647 cabra anti ratón (ambos de Molecular Probes-Invitrogen). A continuación se realizaron 5 lavados de 5 min. con PBS, se añadieron 20 µL del medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, colorante para la tinción fluorescente del ADN) (ProLong Gold antifade with DAPI, Molecular Probes-Invitrogen). Finalmente las cámaras de Permanox se desmontaron y los portaobjetos obtenidos se cubrieron con un cubre-objetos 24x24 (Menzel-Glaser, Afora, Barcelona, España). Para preservar la fluorescencia, las muestras se sellaron con laca de uñas. Los correspondientes controles negativos fueron preparados siguiendo el mismo protocolo pero en ausencia del correspondiente anticuerpo primario.

IV.1.I. Técnicas bioquímicas y moleculares

Para los estudios de biología molecular se establecieron cuatro estadios de análisis por donante/línea celular: SVF (células obtenidas inmediatamente después del proceso de aislamiento), Pase 1 (P1) (células adiposas adherentes humanas después de su primer pase (tras 3-5 días en cultivo)), P3 (células adiposas adherentes humanas tras realizar el tercer pase (10-15 días en cultivo) y P5 (tras haber expandido las células cinco veces

(aproximadamente 30 días después de su aislamiento). Todos los experimentos (n=12) realizados en este trabajo se llevaron a cabo, siguiendo este esquema experimental.

IV.1.1.i. Estudio de expresión de marcadores

Para estudiar el perfil molecular de la indiferenciación de las hASC se utilizó ARN total obtenido de los 15 donantes en los cuatro estadios del estudio previamente establecidos (SVF, P1, P3 y P5). El ARN se aisló a partir de 1.6×10^6 células utilizando el kit de extracción RNeasy kit (Qiagen), siguiendo los protocolos establecidos por la casa comercial. Posteriormente la concentración de ARN total en las muestras se midió mediante de espectrofotometría utilizando Nanodrop (Ver apartado III.1.1.iii)

Para estandarizar las muestras y disminuir el grado de variabilidad entre los pacientes, se agrupó el ARN de 4 pacientes en los diferentes estadios.

El estudio molecular de las muestras durante los diferentes pases se realizó mediante RT-PCR (véase apartados III.1.1.v), seguida de electroforesis para visualizar las bandas de amplificación. Los cebadores utilizados, junto con los tamaños del amplicón y la temperatura de anillamiento se recogen en la tabla 3 (anexada a este trabajo de investigación, Anexo 3), y correspondían a una batería de genes de indiferenciación de mesenquimales, de linaje hematopoyético, y de tejido adiposo.

IV.1.1.ii. Extracción de ARN

El ARN total procedente de las muestras fue obtenido siguiendo el protocolo de extracción de Qiagen (RNeasy mini kit, Qiagen). Para evitar contaminaciones de ADN genómico, las muestras fueron tratadas con DNasa (Qiagen). En el caso de la extracción de ARN procedente del aislamiento de las poblaciones positivas y negativas para ABCG2 y SSEA1, dado el bajo porcentaje de células aisladas, se empleó otro kit comercial optimizado para la extracción de ARN desde 500 células (RNeasy microkit, Qiagen).

IV.1.1.iii. Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Se añadió 1 μ l de muestra al NanoDrop ND-1000 y se obtuvo el electroferograma a partir del cual se calculó la concentración total de ARN y el ratio entre el área de los picos de ARN ribosomal 28S/18S. En nuestro caso, en todas las muestras se obtuvieron ratios comprendidos entre 1,5 y 2 lo que indicaba que la calidad de las muestras era adecuada. Tras las medidas, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

IV.1.1.iv. Síntesis de ADN complementario.

Para la síntesis de ADN complementario, a partir de ARN de las muestras se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). El volumen de reacción de 50 μ L contenía: 5 μ L de RT Buffer 10X, 5 μ L de Random Primers 10X, 2 μ L de dNTP's y 2.5 μ L de la enzima retrotranscriptasa. La síntesis se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf empleando 2 μ g por muestra de ARN total. Las condiciones de reacción fueron

las siguientes: Paso1: 25°C, 10´. Paso 2: 37°C, 120´. Paso 3: 4°C ∞. Durante el proceso también se incluyeron los pertinentes controles negativos

IV.1.I.v. RT-PCR

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo utilizando el kit de Roche FastStart PCR Master Mix. Los 25 µL de reacción contenían: 1µL de ADN complementario de la muestra, 12.5 µL de Mastermix, 9 µL de H₂O y 0.6 µM del mix de cebadores correspondiente a cada gen (ver tabla 3 anexo 3).

El programa utilizado para la amplificación fue: un primer paso de 95°C durante 1 minuto. A continuación comenzaban 38 ciclos de repetición que consistían en 30 segundos a 95°C, seguidos de 30 segundos de la temperatura de hibridación correspondiente a la pareja de cebadores utilizados y por último 45 segundos a 72°C. Para finalizar, se añadió un paso extra de 72°C durante 7 minutos.

Los cebadores utilizados se obtuvieron de distintos artículos o fueron diseñados por nuestro grupo durante la realización de esta tesis doctoral. La especificidad de los cebadores se comprobó mediante el programa Blast, antes de emplearlos. La secuencia, las temperaturas de hibridación correspondientes y el tamaño del amplicón detectado se muestran en la tabla 3 (Ver anexo 3).

En todas las reacciones de PCR se incluyeron los correspondientes controles negativos y positivos (mediante el empleo de tejidos con expresión conocida de cada uno de los genes analizados) así como genes de expresión constitutiva (B2Microglobulina (B2M) y GAPDH). B2Microglobulina (B2M).

IV.1.I.vi. Análisis por electroforesis

Para el análisis de los productos de la RT-PCR se realizó una electroforesis en gel de 1.8% agarosa en presencia de bromuro de etidio, a un voltaje de 80V (8V/cm) hasta que el frente de electroforesis alcanzó el final del gel. La visualización de las bandas de los fragmentos de ADN amplificados y su posterior análisis se llevó a cabo en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad) usando el programa QuantityOne.

IV.1.I.vii. PCR cuantitativa (Q-PCR)

La qPCR se llevó a cabo utilizando el *LightCycler*® 480 system (Roche Diagnostics) en combinación con *LightCycler*® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) según las recomendaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en 20 µL de reacción, los cuales contenían 100 ng de ADNc, 50 pmol del mix de cebadores (Tabla 3, en anexo 3), 10 µL del Mastermix y 7 µL de agua.

La reacción de PCR cuantitativa consistía en un primer paso de activación de la ADN polimerasa FastStart Taq a 95 °C durante 10 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, hibridación a 59 °C durante 20 segundos y extensión a 72 °C durante 15 segundos. Después de la reacción de PCR, la temperatura disminuyó hasta 65 °C y fue aumentando gradualmente hasta 95 °C con una velocidad de 0.2 °C/s para conseguir la “curva de melting”. Los datos fueron analizados utilizando el *LightCycler Software 3.5*

Para todos los cebadores se llevaron a cabo curvas patrones con una cantidad conocida de ADNc, con el fin de poder cuantificar la sobre-expresión o sub-expresión de diferentes genes en nuestras muestras.

Los resultados la expresión fueron normalizados para los dos genes de expresión constitutiva (B2M y β -Actina). En las gráficas se representaron las medias normalizadas del incremento de la expresión para cada gen y se añadía el error estándar para cada muestra.

El paquete estadístico que se utilizó para analizar las diferencias de expresión fue el SPSS Statistics 17.0, empleando los test t de Student o ANOVA. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando el p-valor que obtuvimos era menor al 0.05 con un intervalo de confianza del 0.05. Los datos se consideraron iguales si el p-valor era mayor de 0.05.

IV.1.I.viii. Análisis de microarray

Con el fin de determinar si los cambios introducidos en el protocolo inducían alguna alteración en el patrón de expresión génica de las células a corto o medio plazo, se llevó a cabo un análisis de microarray, comparando los 4 estadios de cultivo (SVF, P1, P3 y P5). Para ello, se aisló el ARN total de 1.6×10^6 células, utilizando el Kit de extracción de ARN de Qiagen (RNeasy kit, Qiagen). Los posibles restos de ADN arrastrados durante el proceso se eliminaron mediante incubación con DNasa durante 10 minutos a 37 °C. La concentración de ARN obtenida, así como la pureza de las muestras, se evaluaron mediante espectroscopía utilizando Nanodrop (Thermo Scientific). En todos los casos, el ratio de pureza de las muestras (A260/A280) fue de 1.8. Antes de la hibridación, también se analizó la calidad de las muestras obtenidas empleando el Bioanalizador de Agilent. El número de integridad del ARN (del inglés RNA Integrity Number: RIN) que se obtuvo fue entre 8.0 y 9.9, confirmando la buena calidad de ARN.

IV.1.I.ix. Análisis de datos de microarray

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la utilización del software *R- Project* y los paquetes apropiados de *Bioconductor*. En primer lugar la corrección de ruido de fondo se realizó mediante la función *subtract* implementada en el paquete R *Limma*.

Con el fin de eliminar todas las posibles variaciones de origen no biológico, los valores densiométricos fueron transformados en escala binaria logarítmica y a continuación normalizados entre los arrays utilizando la función de normalización *Quantiles* también implementada en el paquete *Limma*. Las diferencias entre grupos de expresión se consideraron significativamente diferentes utilizando el método empírico de Bayes, mediante la función *eBayes* también implementada en el paquete *Limma*. El paquete *multitest* de *Bioconductor* fue utilizado para corregir los p-valor originales mediante el método de Benjamini-Hochberg (BH). Aquellos genes con un BH p-valor < 0.05 corregido se seleccionaron como regulados tanto a la baja o a la alta. Las anotaciones funcionales de los genes seleccionados fueron generadas mediante la base de datos Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID), el cual permite la búsqueda de grupos de genes interrelacionados funcionalmente por distintos criterios tales como términos de Gene

Ontology o Kyoto Enciclopedia of Genes and Genomes (KEEG) pathways, entre otros. Finalmente, la herramienta Ingenuity Pathway Analysis (IPA) fue utilizada para la creación de redes funcionales con los genes seleccionados (regulados a la baja y a la alta).

IV.1.J. Diferenciación a precursores mesodérmicos

Para llevar a cabo el ensayo de diferenciación a precursores mesodérmicos, se sembraron 1500 células/cm² a partir de células de pase 5. Los cultivos se mantuvieron en distintos medios capaces de producir células endoteliales, grasa, hueso y cartílago (ver tabla 4). En el procedimiento de inducción de la diferenciación a endotelio, las células se mantuvieron con medio angiogénico durante 7 días. En el caso de la adipogénesis, las células se cultivaron durante 10 días, mientras que el periodo de tiempo se alargó hasta 15 días para conseguir diferenciación a tejido óseo y cartílago. El cultivo de los controles correspondientes se realizó en paralelo, empleando medio de células mesenquimales para el mantenimiento celular. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado y se repitió dos veces.

Tabla 4: Medios inductores para la diferenciación a los distintos derivados mesodérmicos. (Adaptado de Zuk y cols) (Zuk, Zhu et al. 2002)).

Medio inductor	Componentes del medio inductor	Tiempo cultivo
Medio inductor angiogénico	2% FBS, 50 ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGF), 1% P/S y DMEM	7 días
Medio inductor adipogénico	10% FBS, 0.5 mM isobutyl-metillxantina (IBMX), 1 μ M dexametasona, 10 μ M insulina, 200 μ M, indometacina, 1% P/S y DMEM	10 días
Medio inductor osteogénico	10% FBS, 0.1 μ M dexametasona, 50 μ M ácido ascórbico, 10 mM glicerofosfato, 1% P/S y DMEM	15 días
Medio inductor condrogénico	10% FBS, 6.25 μ g/ml insulin, 10 ng/mL Transforming growth factor β (TGF- β) , 50 nM ácido ascórbico, 1% P/S y DMEM	15 días

IV.1.K. Técnicas histológicas

IV.1.K.i. Fijación de las células en cultivo

Para el análisis inmunocitoquímico e histológico de los cultivos, las células se lavaron 2 veces con PBS, para eliminar los restos del medio de cultivo y a continuación se fijaron en PFA (Panreac) al 4% durante 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se conservaron en PB 0.1M con azida sódica al 0.05% hasta el momento de realizar la inclusión para microscopía electrónica.

IV.1.K.ii. Microscopía electrónica

La caracterización morfológica de las muestras se llevó a cabo empleando Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Las células se fijaron en glutaraldehído al 3.5% en PB 0.1M y se post-fijaron para mantener su contenido lipídico, incubando durante 2 horas con tetraóxido de Osmio al 2%. Seguidamente, fueron lavadas, rehidratadas y embebidas en Araldita (Durcupan;Fluka Biochemica, Rokokoma, NY). Una vez finalizado el proceso de inclusión, se cortaron semifinos de 1.5- μ m y se procedió a la tinción de los mismos con 1% azul de toluidina. Para el estudio de las células en detalle, se obtuvieron secciones ultrafinas de (60-70 nm) empleando una cuchilla de diamante. Los cortes ultrafinos se tiñeron con citrato de plomo y se procedió a su estudio empleando el microscopio electrónico FEI Tecnai Spirit .

IV.1.K.iii. Tinciones histológicas

IV.1.K.iii.1. Tinción de Oil Red

La tinción histológica de Oil-Red es una prueba que permite determinar la presencia de gotas lipídicas y por lo tanto de tejido lipídico. Esta determinación se debe a que el Oil Red es un lisocromo, lipófilo e insoluble en medio acuoso. La solución stock del colorante se preparó disolviendo Oil-Red en 2-Propanol (Panreac) en una concentración de 0.5%. El mismo día de su uso se preparó la solución final 6:4 de solución stock de Oil Red y agua respectivamente y los precipitados se descartaron con papel de filtro.

Cuando se tuvo filtrada la solución de uso, las muestras fijadas o en conservante PB-Azida, se lavaron en PB y seguidamente se añadió un volumen de la solución final del colorante suficiente para que cubriera toda la superficie del cultivo y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y en agitación suave. Posteriormente las muestras se lavaron con PBS y se tiñeron durante 5 min con Hematoxilina de Harris (Sigma Aldrich Química S. A.) para teñir los núcleos y contrastar las células. Seguidamente las muestras se lavaron en PBS para visualizar el resultado de la coloración al microscopio invertido de contraste de fases.

IV.1.K.iii.2. Tinción de Azul Alcían

La tinción de azul alcían se llevó a cabo para determinar la presencia de mucopolisacáridos, propios de matriz extracelular de cartílago. El azul alcían es un colorante básico polivalente soluble en agua y su coloración azul se debe a la presencia de átomos de cobre. La solución de azul alcían estaba preparada en un medio ácido (pH 2.5), permitiendo la formación de sales con los grupos ácidos de los mucopolisacáridos y determinando la presencia tanto de mucopolisacáridos sulfatados y carboxílicos como de glicoproteínas carboxiladas y sulfatadas.

Dependiendo del pH al que se prepare la solución colorante, la determinación será más selectiva, siendo a pH de alrededor de 1 el utilizado para teñir únicamente los mucopolisacáridos sulfatados.

La solución colorante de azul alcían (Sigma Aldrich Química S. A.) se preparó a una concentración de 3% de ácido acético glacial (Panreac) ajustado a un pH final de 2.5

Una vez las muestras fueron fijadas y conservadas hasta su posterior análisis, fueron lavadas con PBS. Las muestras se incubaron durante 20 min en la solución colorante previamente filtrada. A continuación, las muestras se lavaron sucesivamente en agua corriente y se analizaron en el microscopio invertido de contraste de fases.

IV.1.K.iii.3. Tinción de Von Kossa

La técnica utilizada para observar la diferenciación a hueso fue la tinción de Von Kossa, indicador de la calcificación de la matriz extracelular, ya que permite la detección de depósitos de calcio o de sales de calcio. La solución colorante que se utilizó fue de nitrato de plata al 1%. Las células en cultivo fijadas se incubaron durante 30 min en la solución de nitrato de plata en oscuridad. A continuación los cultivos se lavaron con dH₂O y para revelar los depósitos de calcio, se expusieron durante 60 min a la luz ultravioleta.

IV.2. PARTE 2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS POBLACIONES EN LA SVF DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO

IV.2.A. Aislamiento de las poblaciones candidatas mediante fluorescence- activated cell sorting (FACS)

IV.2.A.i. Aislamiento de la población ABCG2 positiva

La separación celular se llevó a cabo inmediatamente después del aislamiento. En primer lugar, las células se lavaron en PBS 1X y se incubaron durante 15 min con 1 mM de EDTA en HBSS^{-Mg-Ca} a 37°C. Se añadió HBSS^{-Mg-Ca} para recogerlas y seguidamente fueron centrifugadas a 400g durante 7 min. Se lavaron en PBS suplementado con 1mM de EDTA para evitar la agregación de las células, y se centrifugaron a 400g durante 7 min. Las células se resuspendieron en HBSS^{+Mg+Ca} suplementado con 0.5% de HSA y se filtraron a través de un filtro de tamaño de poro de 30 µm (Life Tech). A continuación llevo a cabo un recuento, y las células se resuspendieron a razón de 10.000.000 células por mL. Posteriormente se procedió a incubarlas con el anticuerpo contra ABCG2-PE (R&D, Ref: FAB995P). Se añadieron 10 µL de anticuerpo por cada 200000 células. Al mismo tiempo se preparó el correspondiente control conteniendo la misma cantidad de células y 5 µL del isotipo correspondiente. La incubación se llevó a cabo durante 1h a 4°C. Una vez finalizada, las células se lavaron tres veces en PBS con 1mM de EDTA. Las muestras se llevaron al Cell-Sorting (MoFlo™ XDP (Beckman- Coulter)) para proceder a su separación. Una vez separadas, se llevó a cabo su cultivo y posterior caracterización mediante TEM (Apartado III.1.k.ii) inmunocitoquímica y PCR (ver apartados III.1.l.i,ii,iii,iv,v,vi).

IV.2.A.ii. Aislamiento de la población SSEA1 positiva

Las células se lavaron en PBS 1X y se incubaron durante en Triplex® (Gibco) durante 5 minutos. A continuación se bloqueó la reacción con medio de cultivo y se centrifugaron a 400g durante 7 min. Tras la centrifugación, se resuspendieron en HBSS^{+Mg+Ca} con 0.5% de HSA durante 15 minutos y se filtraron a través de un filtro con tamaño de poro de 30 µm. A continuación se procedió al recuento celular y se añadió el anticuerpo a una razón de 10 µL por millón de células. Las células se incubaron en el anticuerpo durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron en HBSS^{+Mg+Ca} con 0.5% de HSA, se centrifugaron a 700 g durante 7 min. Finalmente, se resuspendieron en 1 mL de PBS cada 10.000.000 de células y se llevaron al citómetro de flujo para su aislamiento.

IV.2.A.iii. Inmunocitoquímica contra ABCG2 y SSEA1

Las muestras se lavaron en PBS y se bloquearon en tampón bloqueo 10% NGS, 0.1% BSA y 0.3% triton-100X durante 1h a RT en agitación suave. Seguidamente las células se incubaron en los correspondientes anticuerpos primarios: α-ABCG2 (MAB4155, Chemicon, en una dilución 1:100 en tampón bloqueo) y α-SSEA1 (MAB4301, Chemicon). Las incubaciones tuvieron lugar durante toda la noche en agitación moderada y a 4°C. Finalizada el paso del anticuerpo primario, las células se lavaron en PBS y se añadió el correspondiente anticuerpo secundario, para las muestras marcadas con el anticuerpo α-ABCG2, se añadió el Alexa⁵⁵⁵ goat-α-mouse y en el caso del SSEA1, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa⁴⁸⁸ goat-α-rabbit, ambas a diluciones 1:600 en tampón bloqueo. Las incubaciones tuvieron lugar durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave.

Posteriormente, las muestras se lavaron y se incubaron con DAPI a una dilución 1:2500 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se lavaron, montaron en FluorSaveTM. para preservar la fluorescencia y se sellaron para evitar que las muestras se secan. La detección de la presencia de las proteínas se realizó utilizando un microscopio confocal Leica, modelo SP2.

IV.2.A.iv. Inmunocitoquímica doble de marcadores de superficie: ABCG2 y SSEA1

Las muestras se lavaron con PBS para eliminar los restos de la azida en la que se conservaban los cubres y tras los lavados las muestras se bloquearon en solución bloque que contenía: 10% NGS, 0.1% BSA y 0.3% triton-100X en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Finalizado el proceso de bloqueo, las muestras se incubaron en el anticuerpo primario α-ABCG2 (MAB4155, Chemicon) utilizándose una dilución 1:100 en tampón bloqueo. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C y en agitación. Tras la incubación con el anticuerpo αABCG2, las muestras se lavaron en PBS y se marcaron con el anticuerpo secundario Alexa⁵⁵⁵ goat anti Mouse (Invitrogen) utilizándose una dilución 1:600 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación la

inmuno doble se continuó con la incubación con el anticuerpo primario α -SSEA1-Alexa⁴⁸⁸ (MAB4301X, Chemicon) con una dilución 1:100 en tampón bloqueo. La incubación se realizó durante toda la noche en agitación a 4°C. Para finalizar las muestras se lavaron en PBS y se incubaron en DAPI para teñir los núcleos, en una dilución 1:2500 durante 15 min a temperatura ambiente. Los cubres se lavaron en PBS, se montaron utilizando FluorSaveTM y se sellaron.

IV.2.B. Estudios de diferenciación dirigida *in vitro* para comprobar la potencialidad de las células SSEA+

La capacidad pluripotente para diferenciarse hacia diversos tipos precursores celulares de las tres hojas embrionarias se comprobó mediante el cultivo de éstas en diferentes medios inductores.

IV.2.B.i. Diferenciación a precursores mesodérmicos

La diferenciación de las células SSEA1⁺ y SSEA1⁻ hacia células endoteliales se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Prado López y col. 2010 (Prado-Lopez, Conesa et al. 2010).

IV.2.B.ii. Diferenciación a precursores endodérmicos

Para el ensayo de diferenciación hacia tipos celulares endodérmicos se emplearon medios inductores para diferenciar las hASC hacia células hepáticas. Las células SSEA1⁺ y SSEA1⁻ se sembraron a una densidad de $5-10 \times 10^3$ células/cm² hasta que llegaron a alrededor de un 85% de confluencia. Se utilizó el protocolo descrito por el grupo de la Dra. Gómez Lechón (Bonora-Centelles, Castell et al. 2008). Las hASC aisladas se cultivaron en un medio compuesto de DMEM libre de suero y suplementado con 20 ng/mL EGF y 10 ng/mL bFGF, durante 48 horas, tras lo que le siguió un protocolo de diferenciación que consistía en el cultivo de las células en un medio que estaba compuesto por DMEM, 20 ng/mL HGF, 10 ng/mL bFGF y nicotinamida 4.9 mM durante 14 días. Los medios se renovaban 2 veces por semana.

IV.2.B.iii. Diferenciación a precursores ectodérmicos

Se eligió como ejemplo de diferenciación de las hASC aisladas hacia líneas celulares de origen ectodérmico, las células neuronales y gliales. La diferenciación tuvo lugar mediante el cultivo de estas células con un medio inductor neuronal. El protocolo que se siguió fue el modificado por el grupo del Dr. HE Rice (Safford, Safford et al. 2004). Las ASC se dejaron crecer hasta que llegaron a un 60 % de confluencia. Una vez en la densidad deseada, las células sufrieron un pretratamiento con DMEM y 20% de FBS durante 24h. Después, se cultivaron durante 1 semana el medio control suplementado con 10 ng/mL de EGF y 20 ng/mL de bFGF. Posteriormente se retiró el pretratamiento y se añadió el medio de inducción neuronal que contenía DMEM con hidroxianisola butilada (BHA) 200 μ M, KCl 5 mM, ácido valproico 2 μ M, forskolina 10 μ M, hidrocortisona 1 μ M, insulina. La diferenciación se llevó a cabo durante 7 días.

IV.2.B.iv. Otras técnicas utilizadas en el estudio

Cebadores utilizados en el estudio molecular de las hASC (Tabla 3 en Anexo 3), tanto destinados a la técnica de RT-PCR como para qPCR. Para cada gen se define el tipo de marcador que está considerado, su secuencia forward (5' a 3'), su secuencia reverse (3' a 5'), la temperatura de anillamiento que se utilizó y el tamaño de pares de bases del producto de amplificación (amplicón).

IV.2.B.v. Determinación de proteínas mediante inmunofluorescencia

Las células se lavaron en PBS 0.1M, para eliminar los restos del conservante azida. Seguidamente se permeabilizaron en PBS 0.1M-0.1Triton-Tx durante 15 min. Posteriormente las muestras se bloquearon en una solución de PBS 0.1M -0.2% Albúmina bovina (BSA) suplementado con leche desnatada al 5% y suero de cabra al 3%. El anticuerpo primarios que se utilizó fue el Factor Von Willebrand (VWF, ab6994, Abcam, a una dilución de 1:100 en el tampón bloqueo), y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Los anticuerpos primarios fueron lavados y las muestras se incubaron el anticuerpos secundarios correspondiente: A555 goat α -rabbit. Las células se lavaron en PBS y para la visualización de los núcleos celulares se incubaron durante 15 minutos y a temperatura ambiente en 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (D9542, Sigma Aldrich), colorante para la tinción del ADN. Las muestras fueron montadas en FluorSave™ Reagent (Calbiochem). Para preservar mejor la fluorescencia, los cover se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron con laca de uñas y se visualizó utilizando un microscopio confocal Leica, modelo SP2.

RESULTADOS

V.RESULTADOS

V.1. OBJETIVO I. DISEÑO DE UN MÉTODO DE AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO SIN REACTIVOS DE ORIGEN ANIMAL

V.1.A. Evaluación y sustitución de los reactivos de origen animal

V.1.A.i. Modificaciones y comparación con otros métodos previamente descritos

Tras el aislamiento y cultivo de las hASC empleando nuestro procedimiento, se observó cómo las células mantenían su morfología fibroblástica, sin apreciarse diferencias con respecto a los cultivos previamente establecidos por otros autores para estas mismas células (Figura 8) (Dazzi, Ramasamy et al. 2006).

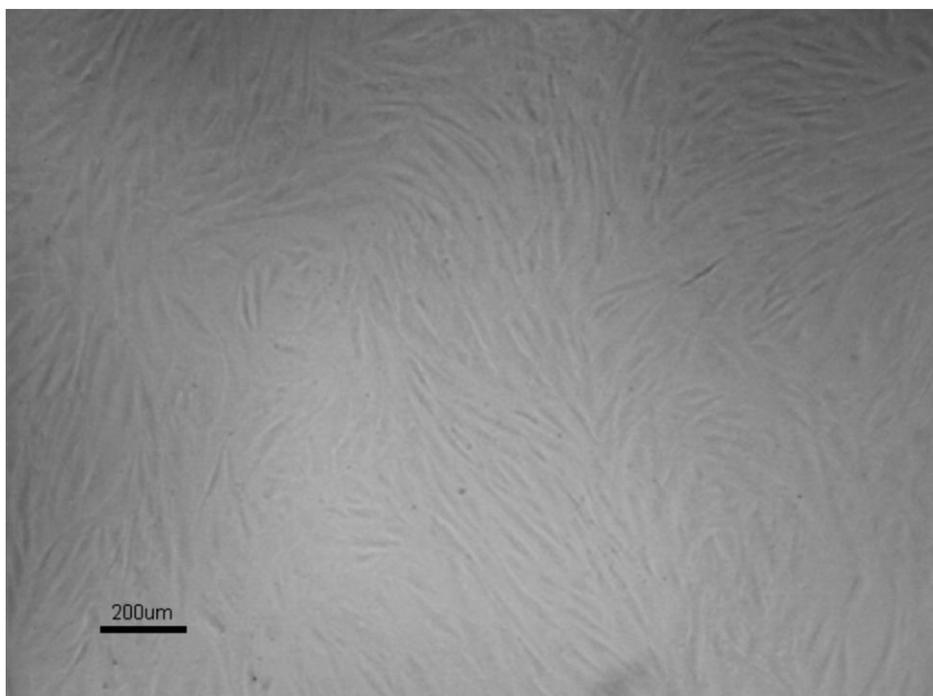


Figura 8: Monocapa de células madre hASC aisladas utilizando nuestro protocolo. Imágenes tomadas mediante MO de contraste de fases. Se observa la morfología fusiforme de estas células.

Posteriormente, los cultivos fueron estudiados al MO mediante cortes semifinos.

V.1.A.ii. Comparativa molecular entre los dos métodos de aislamiento, xenogénico vs no xenogénico

Tras comprobar la ausencia de diferencias morfológicas notables entre las células obtenidas empleando nuestro método y las aisladas usando la técnica clásica con componentes animales, se procedió a realizar un análisis exhaustivo para la expresión de marcadores moleculares mediante RT-PCR. Con ello se pretendía demostrar que las células expresaban los marcadores característicos de su linaje y capacidades. Así mismo, se realizó un seguimiento de la evolución de ellos a lo largo del proceso de cultivo, empleándose el

esquema de trabajo establecido en el apartado de diseño experimental (Ver apartado de material y métodos III.1.D).

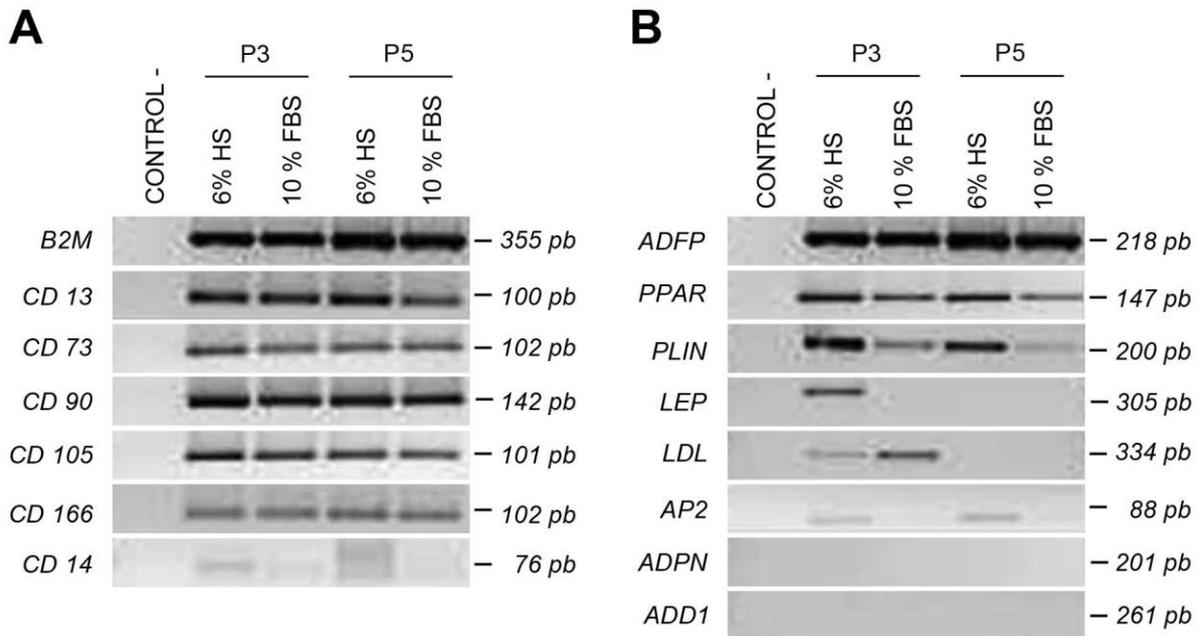


Figura 9: RT-PCR de hASC mantenidas con FBS o HS durante los pases 3 y 5. (A) Caracterización de las hASC mediante marcadores mesenquimales y hematopoyéticos (CD14). Se observa expresión de los marcadores mesenquimales, mientras que el CD14 (ejemplo de marcador hematopoyético) se observa que su expresión desaparece. (B) Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación a tejido adiposo y adipocitos maduros. En la figura se incluyen B2M (gen de expresión constitutiva) y el correspondiente control negativo.

Nuestro siguiente objetivo, era comprobar que la población celular que conseguíamos aislar, contenía células madre mesenquimales y que, a pesar de las modificaciones introducidas en los protocolos de expansión y mantenimiento, conseguíamos preservar su capacidad multipotente.

Como podemos observar en la Figura 9-A nuestros cultivos expresan marcadores característicos de células madre mesenquimales de la grasa: CD13, CD73, CD90, CD105, CD166. Tal y como se muestra en la Figura 9-A, la expresión de CD14, marcador de precursores hematopoyéticos, desaparecía a medida que evolucionaba el cultivo en ambos casos.

A continuación, se procedió a analizar la expresión de marcadores característicos de tejido adiposo y a estudiar la evolución de los mismos, tras descartar la fracción de adipocitos maduros durante el proceso de aislamiento de las hASC (Figura. 9-B). Lo que se pretendía con esto, era tener la seguridad de que mediante nuestro procedimiento, conseguíamos aislar una fracción de células madre estromales de la grasa heterogénea, eliminando las células de grasa maduras. Así pues, se utilizaron marcadores específicos de células de la grasa muy diferenciadas (Adiponectina, Leptina y ADD1) o de genes que intervienen en funciones características, como secuestro de ácidos grasos (AP2) y almacenaje de gotas lipídicas (Perilipina). Como puede observarse en la Figura. 9-B, con la excepción de ADD1,

que no aparece en ninguna de las etapas de nuestro cultivo, la expresión de Adiponectina, Leptina, Perilipina y AP2, va disminuyendo paulatinamente a medida que continuamos con el proceso de mantenimiento y expansión de muestras. En el caso de AP2, la disminución fue más drástica en las muestras mantenidas con FBS. Además de estos genes, se incluyeron otros cuya expresión es característica de precursores de adipocitos, o que se detectan en estadios tempranos de diferenciación a tejido adiposo blanco, como ADFP (marcador temprano de precursores de adipocitos), LPL (marcador ubicuo en precursores de grasa y que responde a insulina) y PPAR2 (receptor de membrana, que se encarga de disparar el proceso de adipogénesis). Al observar la Figura. 9-B, vemos que, a diferencia de los anteriores, estos tres marcadores se expresan durante todas las fases de aislamiento, mantenimiento y expansión del cultivo, especialmente en los cultivos mantenidos sin reactivos animales. Hay que tener en cuenta, que la población celular obtenida tras llevar a cabo el protocolo de aislamiento, es heterogénea, por lo que podría contener algunos precursores de adipocitos en estadios tempranos de diferenciación. Además, no hay que olvidar, que las células madre mesenquimales aisladas, todavía siguen conservando su capacidad para diferenciarse a adipocitos, por lo que es muy probable que conserven estos receptores que les permiten detectar la necesidad de que se desencadene esta diferenciación en un momento o condiciones determinados.

V.1.A.iii. Análisis del crecimiento celular y evolución del cultivo a lo largo del tiempo

Basándonos en estudios previos, (Kocaoemer, Kern et al. 2007), se procedió a estudiar la curva de crecimiento de las células mantenidas empleando ambos protocolos, para evaluar las posibles diferencias entre los mismos. Para ello, se sembraron células en P3 a razón de 200 células/cm² y se mantuvieron utilizando medio de cultivo, suplementado con 6% de HS o con 10% de FBS. El conteo celular se realizó diariamente desde el día 4 del cultivo al día 11. El uso de HS en el medio de cultivo propició un aumento de la proliferación, lo que dificultó la evaluación de la confluencia en este grupo.

Las células hASC cultivadas en medio suplementado con el suero humano, proliferaban más rápido que aquellas cultivadas con FBS (día 0-1 versus día 4, respectivamente) (Figura 10).

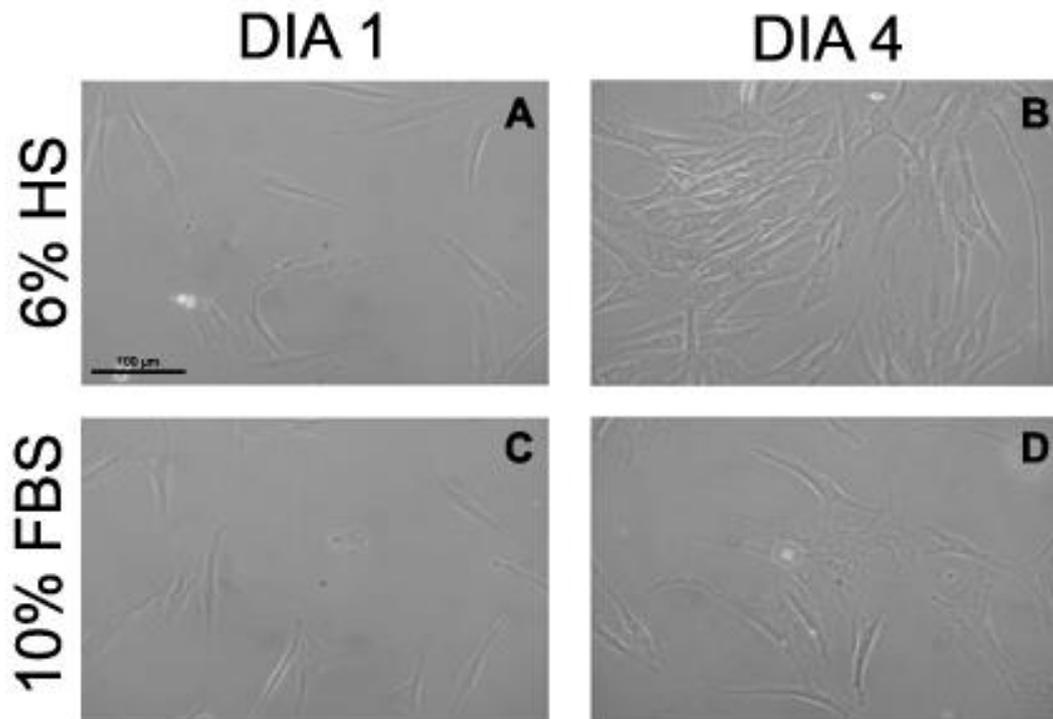


Figura 10: Crecimiento celular en medio de cultivo suplementado con 6% de HS o 10% de FBS a días 1 y 4 de cultivo. A) Cultivo de hASC a día 1, en medio suplementado con HS. B) Cultivo de hASC a día 4 en medio suplementado con HS. C) Cultivo de hASC a día 1 en medio suplementado con FBS. D) Cultivo de hASC a día 4 en medio suplementado con FBS.. Imágenes tomadas mediante MO de contraste de fases

Con respecto a la curva de crecimiento, como puede observarse en la Figura 11, en los primeros días del ensayo, el crecimiento de las ASC en medio con HS era exponencial alcanzando un máximo entre el día 4 ($9.3 \times 10^3 \pm 3.7 \times 10^3$ células /cm²) y el día 6 ($5.1 \times 10^4 \pm 4.1 \times 10^3$ células /cm²). Durante este periodo, el tiempo necesario para que se doblase la población celular, del inglés “population doubling time (PDT)” era menor de 24 horas para las células mantenidas con HS. A partir del día 6, la proliferación celular se ralentizaba, ya que los cultivos llegaban a la confluencia y la tasa de crecimiento celular disminuía, debido a la falta de espacio intercelular. En el día 11, las células aparecían agrupadas en paralelo, indicando que habían alcanzado la fase de Plateau, dejando de dividirse. En este momento se levantaron para proceder a su contaje. El número total de células obtenido fue de $7.8 \times 10^4 \pm 3.8 \times 10^3$ células /cm².

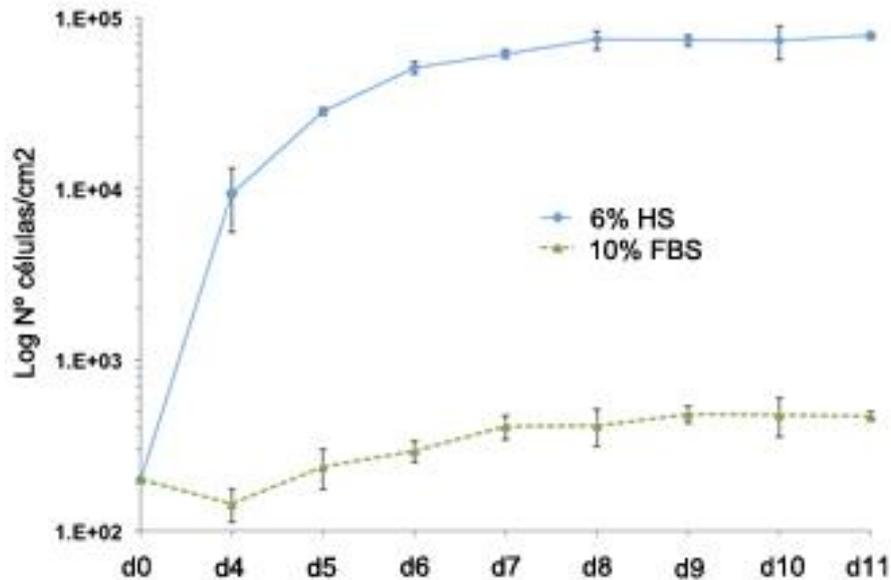


Figura 11: Curva del crecimiento celular en medio de cultivo suplementado con dos sueros de diferente origen. Gráfica comparativa del crecimiento celular con medio suplementado añadiendo 6% de HS (línea azul) y medio suplementado con 10% de FBS (línea verde). Se aprecia un aumento mayor en aquellos con HS.

Por el contrario, el recuento de células mantenidas en medio suplementado con FBS en día 4 de cultivo era de $1.43 \times 10^2 \pm 3.1$, indicando una tasa de proliferación de 1.65 veces con respecto al día de la siembra. El ratio de división aumentaba progresivamente hasta día 7 ($4.06 \times 10^2 \pm 7.9 \times 10^1$ células /cm²). El ratio de división para las células mantenidas con FBS era considerablemente más bajo que para las cultivadas con HS. El tiempo de doblaje poblacional, es también más largo que para las hASC. Estos resultados confirman que el uso de HS como suplemento en el medio de cultivo de estas células aumenta su proliferación.

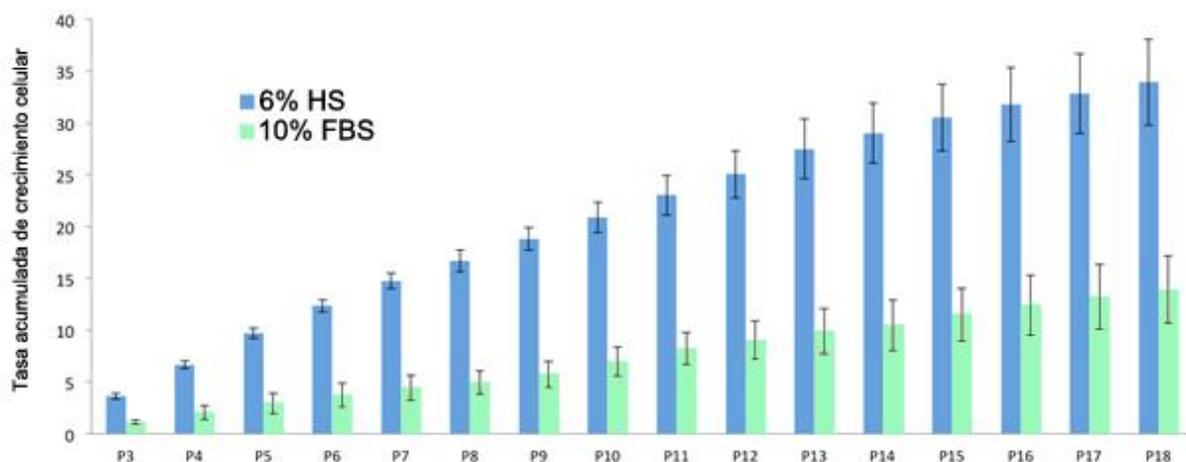


Figura 12: Media acumulativa de la tasa de crecimiento celular para HS (barras en azul) y FBS (barras en verde). En ambos casos se observa un aumento del crecimiento celular, especialmente patente en los cultivos mantenidos con HS.

Atendiendo a la cinética de proliferación (Figura 12), al comparar los ratios de proliferación celular en ambas condiciones de cultivo, se apreciaron diferencias significativas. Desde el momento de la siembra, las células cultivadas con HS, mostraban mayor capacidad de proliferación, alcanzando un nivel de 33.9 ± 4.1 en pase 18, mientras que las mantenidas en FBS presentaban valores de 13.9 ± 3.3 en el mismo pase. Cabe señalar que estas diferencias fueron claras y consistentes desde el inicio del experimento.

Una vez demostrado que el empleo de reactivos de origen animal durante el proceso de aislamiento y mantenimiento no parecía aportar ninguna ventaja a las hASC, decidimos continuar utilizando el protocolo que habíamos diseñado y validado, para profundizar más en las características de las líneas celulares obtenidas.

En conclusión, el uso de HS contribuye al mantenimiento de la capacidad multipotente, y favorece la expansión, al aumentar la tasa de crecimiento.

V.1.B. Efecto del uso de tampón de lisis de eritrocitos en las células madre de tejido adiposo aisladas sin reactivos animales

Las células madre son extremadamente sensibles a los choques osmóticos (Xu, Liu et al. 2012). Considerando que todos los protocolos descritos hasta el momento empleaban un paso final de lisis para eliminar la presencia de eritrocitos en los cultivos, nos planteamos si el uso de dicho tampón de lisis, podría afectar de alguna forma a las propiedades de las hASC o incluso disminuir la heterogeneidad celular de las mismas.

Con el fin de estudiar los efectos de este tampón en las células, una vez realizado el aislamiento de las hASC empleando nuestro protocolo, se procedió a separar la muestra en dos partes iguales. Una de ellas se preservó intacta para la realización de los experimentos posteriores, mientras que la otra fue sometida a la acción del tampón de lisis de eritrocitos. Los detalles de la composición e incubación se llevaron a cabo siguiendo el protocolo establecido por Zuk et al 2001 (Zuk, Zhu et al. 2001), y han sido descritos en la sección de materiales y métodos de esta tesis doctoral.

V.1.B.i. Estudio de las diferencias morfológicas entre células tratadas/no tratadas con tampón de lisis de eritrocitos

Las células obtenidas a partir de la SVF utilizando TL y sin utilizar TL, se mantuvieron en cultivo para valorar el crecimiento de las células. Se observó que tanto las células aisladas eliminando el tampón de lisis (Figura. 13-A) como las células aisladas con el tampón (Figura. 13-B), mantenían su morfología fibroblástica y crecimiento característico en unidades formadoras de colonias, sin apreciar diferencias destacables.

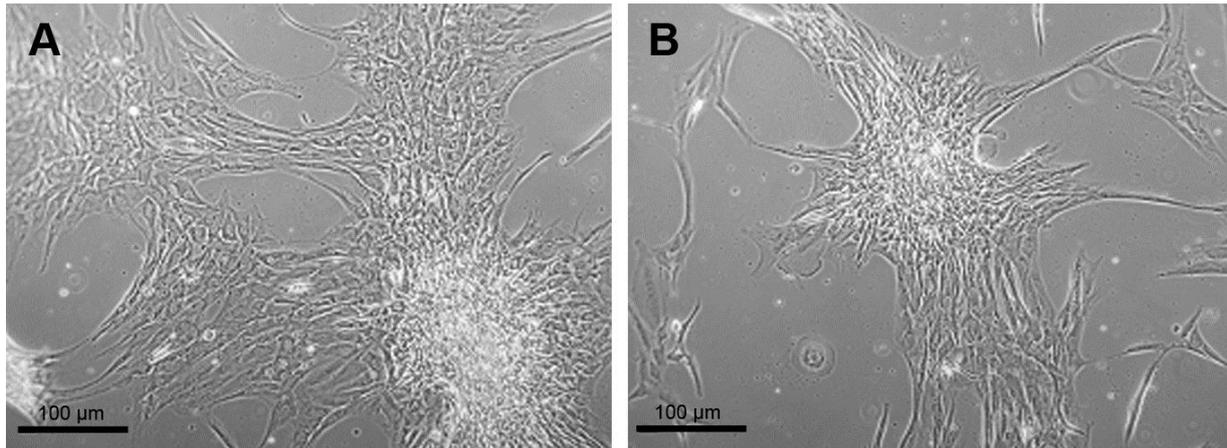


Figura 13: Comparativa entre los dos métodos de aislamiento sin (A) y con tampón de lisis (B). Imágenes tomadas mediante MO de contraste de fases..

V.1.B.ii. Caracterización molecular entre los dos métodos de aislamiento con y sin tampón de lisis

Para evaluar el efecto del tampón a nivel de la expresión génica, se realizó un primer análisis empleando RT-PCR. Para ello, se intentaron observar variaciones en dos de los marcadores de hASC por excelencia, CD73 y CD90 (Figura 14). El análisis nos permitió detectar pequeñas diferencias de expresión para CD90 (Figura. 14-A).

Como se ha mencionado con anterioridad, las células madre, especialmente aquellas procedentes de estadios tempranos de desarrollo, son muy sensibles a los choques osmóticos. Dado que nuestra población era heterogénea, en el momento de realización de esta tesis doctoral, nos planteamos la posibilidad de que la fracción celular aislada pudiese contener precursores más indiferenciados por ello, decidimos estudiar el efecto del tampón de lisis en la expresión de marcadores de diferenciación temprana, característicos de células madre embrionarias (Figura 14-B). Los niveles de *OCT 3/4* y *Melk* no parecían verse afectados por el uso del tampón de lisis, mientras que la expresión de la isoforma exógena de *Nanog* (característica de células madre embrionarias), *ABCG2* y *SSEA1* presentaban pequeñas diferencias.

Estas observaciones, nos llevaron a tratar de cuantificar las diferencias observadas empleando para ello qPCR.

Tal y como se muestra en la Figura 15, al eliminar el tampón de lisis en el procedimiento de aislamiento de las hASC, la expresión de CD90 aumentaba significativamente (P-valor < 0.05). Como ya sucedía para RT-PCR, la expresión de *Oct-3/4* no parecía verse afectada por el uso del tampón. Sin embargo, el uso del mismo si afectaba a la expresión de otros genes de indiferenciación temprana como *FOXP3*, *Nanog* o *REX1*. Los resultados obtenidos para *ABCG2* y *SSEA1* mediante RT-PCR, se confirmaron mediante QPCR, dejando patente que el proceso de lisado de eritrocitos reducía su expresión.

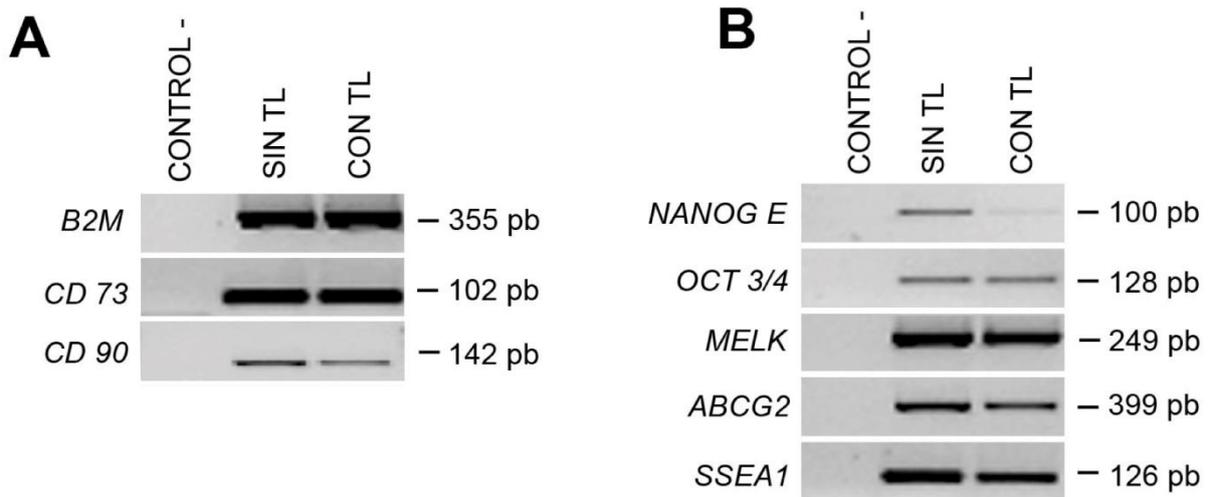


Figura 14: Análisis molecular Expresión molecular de marcadores mesenquimales (A) y de desarrollo temprano (B) en hASC aisladas con y sin tampón de lisis (TL). A) La expresión de los marcadores mesenquimales estudiados se mantiene, pudiendo apreciarse un ligero aumento en CD90. B) Los marcadores de desarrollo temprano se mantienen en ambos casos habiendo una ligera diferencia en la expresión del NANOG E, siendo mayor en el método que no se utiliza TL. En la Figura se incluye un control interno de carga correspondiente a la B2M (gen de expresión constitutiva) y el control negativo de no expresión (Control -).

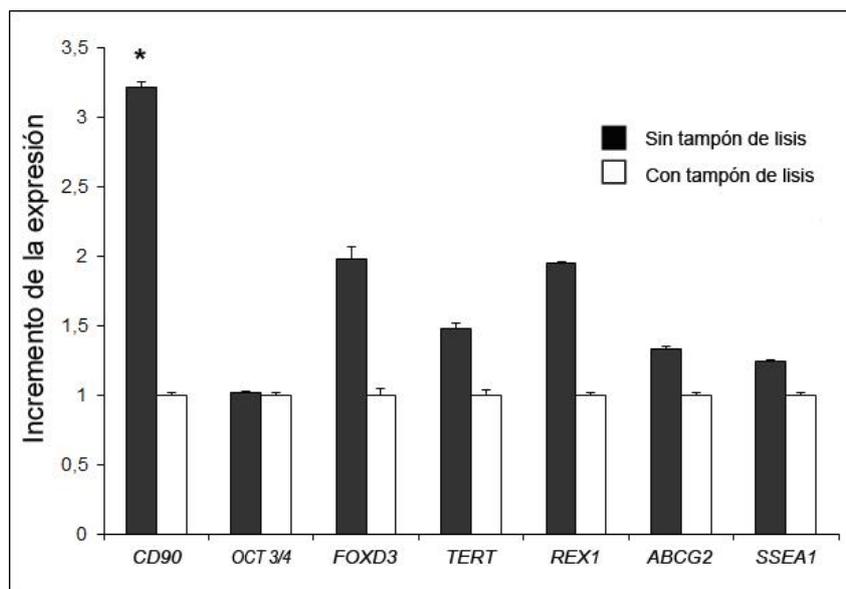


Figura 15: Análisis cuantitativo de la expresión de marcadores mesenquimales de indiferenciación y de desarrollo temprano mediante Q-PCR. Las barras negras muestran los niveles de expresión para las hASC aisladas sin tampón de lisis. Los valores obtenidos para las células aisladas con tampón se han representado mediante barras blancas. Las diferencias entre los valores de expresión obtenidos para CD90 fueron significativos con un P-valor < 0.05 (*)

Por último, evaluamos mediante análisis morfológico las ASC obtenidas con y sin tampón de lisis en el procedimiento de extracción (Figura 16). Después de cultivar las células durante 5 días podíamos apreciar un aumento de densidad de las células en cuyo aislamiento no incluíamos el tampón de lisis (figura 16-A). Por otro lado, las células en cuya extracción se utilizaba el tampón de lisis, (figura 16-B), mantenían la morfología fusiforme descrita.

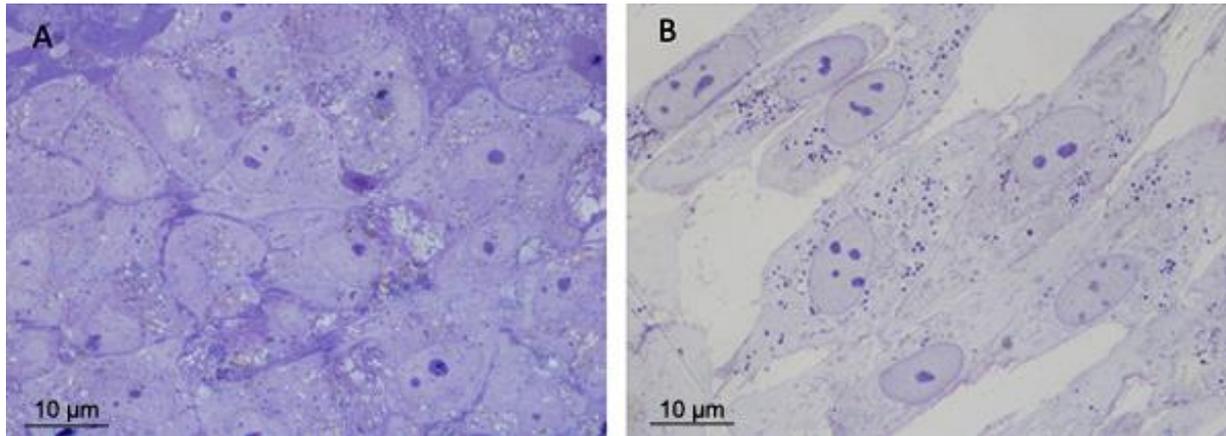


Figura 16. Semifinos de hASC aisladas con/sin tampón de lisis tras 5 días en cultivo. A) Células aisladas a partir del lipoaspirado L87 sin emplear el tampón de lisis. Se aprecia el aumento de la densidad así como la heterogeneidad de las células presentes en el cultivo. B) Células obtenidas con tampón de lisis. Como puede apreciarse, la práctica totalidad de las células presentes en el cultivo presenta una morfología acorde con lo descrito para las células de SVF por otros autores.

A modo de conclusión las pruebas llevadas a cabo, eliminando el tampón de lisis del protocolo de aislamiento de las hASC, sugería que el descarte de la lisis de los eritrocitos permitía mantener, preservar y proteger la capacidad indiferenciada de las células madre, frente a la no eliminación de estos. El uso de tampón podía influir en la cantidad y heterogeneidad de la población.

A continuación se procedió a realizar una caracterización en profundidad de las hASC obtenidas con nuestro procedimiento.

V.1.C. Caracterización de las hASC obtenidas sin reactivos animales ni tampón de lisis

Tras la extracción y cultivo de las hASC, se procedió a realizar un análisis exhaustivo para la expresión de marcadores moleculares mediante RT-PCR. Con ello se pretendía demostrar que las células expresaban los marcadores característicos de su linaje y capacidades. Así mismo, se realizó un seguimiento de la evolución de ellos a lo largo del proceso de cultivo, empleándose el esquema de trabajo establecido en el apartado de diseño experimental (ver material y métodos).

En primer lugar, se procedió a analizar la expresión de marcadores característicos de tejido adiposo y a estudiar los posibles cambios que podían tener lugar a lo largo del cultivo, tras descartar la fracción de adipocitos maduros durante el proceso de aislamiento de las hASC (Figura 17-A). Con esto, pretendíamos tener la seguridad de que mediante nuestro procedimiento, conseguimos aislar una fracción de células madre estromales de la grasa heterogénea, eliminando las células de grasa maduras. Para ello se utilizaron marcadores específicos de células de la grasa muy diferenciadas (AdipoQ, Leptina y SREBF1) o de genes que intervienen en funciones características de estadios de diferenciación terminal, como secuestro de ácidos grasos (AP2) y almacenaje de gotas lipídicas (Perilipina). Como puede observarse en la Figura 17-A, con la excepción de ADD1, que no aparece en ninguna

de las etapas de nuestro cultivo, la expresión de Adiponectina, Leptina, Perilipina y AP2 es positiva en la SVF, pero va disminuyendo paulatinamente a medida que continuamos con el proceso de mantenimiento y expansión de nuestras células, incluso hasta dejar de expresarse en P1 en el caso de Adiponectina.

Además de estos genes, se incluyeron otros cuya expresión es característica de precursores de adipocitos, o que se detectan en estadios tempranos de diferenciación a tejido adiposo blanco, como ADFP (marcador temprano de precursores de adipocitos), LPL (marcador ubicuo en precursores de grasa y que responde a insulina) y PPAR2 (receptor de membrana, que se encarga de disparar el proceso de adipogénesis). Al observar la Figura 17-A, vemos que, a diferencia de los anteriores, estos tres marcadores se expresan durante todas las fases de aislamiento, mantenimiento y expansión del cultivo. Hay que tener en cuenta, que la población celular obtenida tras llevar a cabo el protocolo de aislamiento, es heterogénea, por lo que podría contener algunos precursores de adipocitos en estadios tempranos de diferenciación. Además, no hay que olvidar, que las células madre mesenquimales aisladas, todavía siguen conservando su capacidad para diferenciarse a adipocitos, por lo que es muy probable que conserven estos receptores que les permiten detectar la necesidad de que se desencadene esta diferenciación en un momento o condiciones determinados.

Nuestro siguiente objetivo, fue comprobar que la población celular que conseguíamos aislar, contenía células madre mesenquimales y que, con las modificaciones introducidas en los protocolos de expansión y mantenimiento, era posible preservar su capacidad mesenquimal, eliminar sus características moleculares de tejido adiposo, perder su perfil molecular de células hematopoyéticas y mantener los marcadores embrionarios.

Como podemos observar en la Figura 17-B, nuestros cultivos expresaban marcadores característicos de células madre mesenquimales: *CD13*, *CD29*, *CD44*, *CD73*, *CD90*, *CD105* y *CD166*, los cuales en general se mantenían durante todo el diseño experimental en el que tenía lugar el cultivo de las ASC. También comprobamos la expresión de marcadores de células madre hematopoyéticas como *CD14*, *CD34*, *CD45*, *CD133* o *CD144* (Figura 17-B), que se detectaban en las fases iniciales pero iban desapareciendo progresivamente hasta en algunos casos como fue el *CD45* dejar de expresarse. Tras comprobar este hecho, analizamos si dentro de esta población heterogénea, existían células que expresaban marcadores de indiferenciación tempranos, es decir, si existía la posibilidad de que hubiese algún precursor pluripotente. Mediante la utilización de marcadores embrionarios, se observaba que en todas las etapas de nuestros cultivos se podía detectar expresión (Figura 17-C). En el caso de *NANOG* y *OCT4* 3/4, aunque la expresión era variable a lo largo del cultivo, en fase 5 se observaba que continuaba existiendo, al igual que *FLK1*. Particularmente, en el análisis de la expresión de la telomerasa (*TERT*), al igual que en *FOXD3*, esta disminución era muy evidente, incluso se dejaba de detectar expresión. Sin embargo, cuando analizábamos otros genes característicos de indiferenciación como fueron *REX1*, *MELK* y *ABCG2*, su expresión se mantenía en todos los pases del estudio en unos niveles constantes.

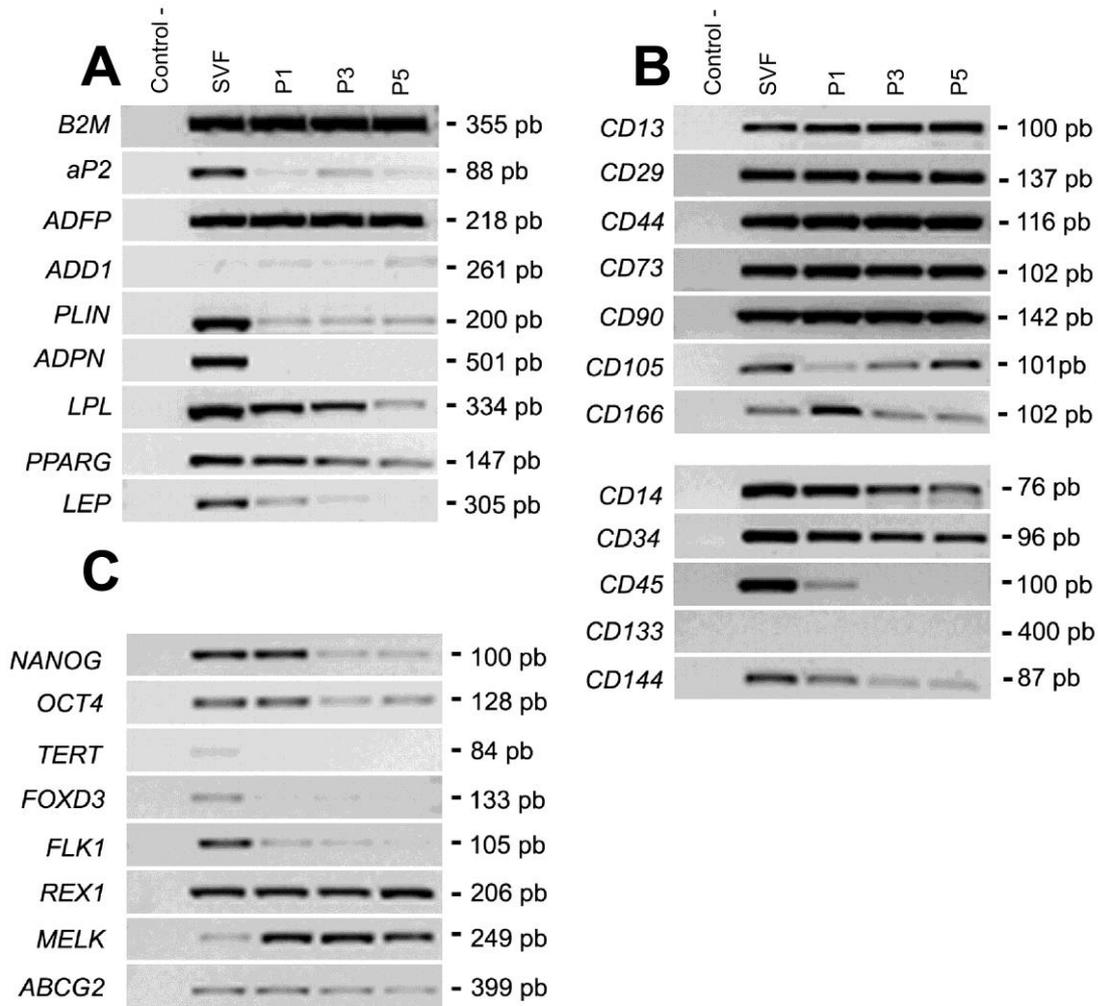


Figura 17: Caracterización molecular de las hASC aisladas y cultivadas durante 5 pases. A) Expresión de marcadores característicos de tejido adiposo. En general existe una disminución de expresión de los marcadores a medida que avanza el cultivo, siendo el pico más alto después del aislamiento. B) Expresión de marcadores de células madre mesenquimales y hematopoyéticas. La expresión de los marcadores mesenquimales se mantiene constante, mientras que la expresión de los hematopoyéticos decrece. C) Expresión de marcadores de células madre pluripotente. Existen resultados dispares en este caso ya que para algunos marcadores (OCT4 y Nanog) la expresión disminuye pero se mantiene, mientras que en otros parece mantenerse desde el primer momento del aislamiento (MELK, REX y ABCG2). En la Figura se incluye un control interno de carga correspondiente a la B2M (gen de expresión constitutiva) y el control negativo de no expresión (Control -).

Una vez detectada la expresión de marcadores adipogénicos, mesenquimales, hematopoyéticos y de indiferenciación temprana mediante RT-PCR, quisimos cuantificar cómo variaba la expresión de algunos de ellos a lo largo del cultivo (Figura 18). Para ello, se llevó a cabo un análisis mediante qPCR de muestras recogidas en los puntos de estudio establecidos. Únicamente observamos diferencias significativas (p -Valor < 0.05) para el transportador ABCG2, cuya expresión se reducía drásticamente durante la evolución del cultivo. Esto nos indicaba que el momento óptimo para aislar la población ABCG2+, era inmediatamente después de finalizar el aislamiento de las hASC.

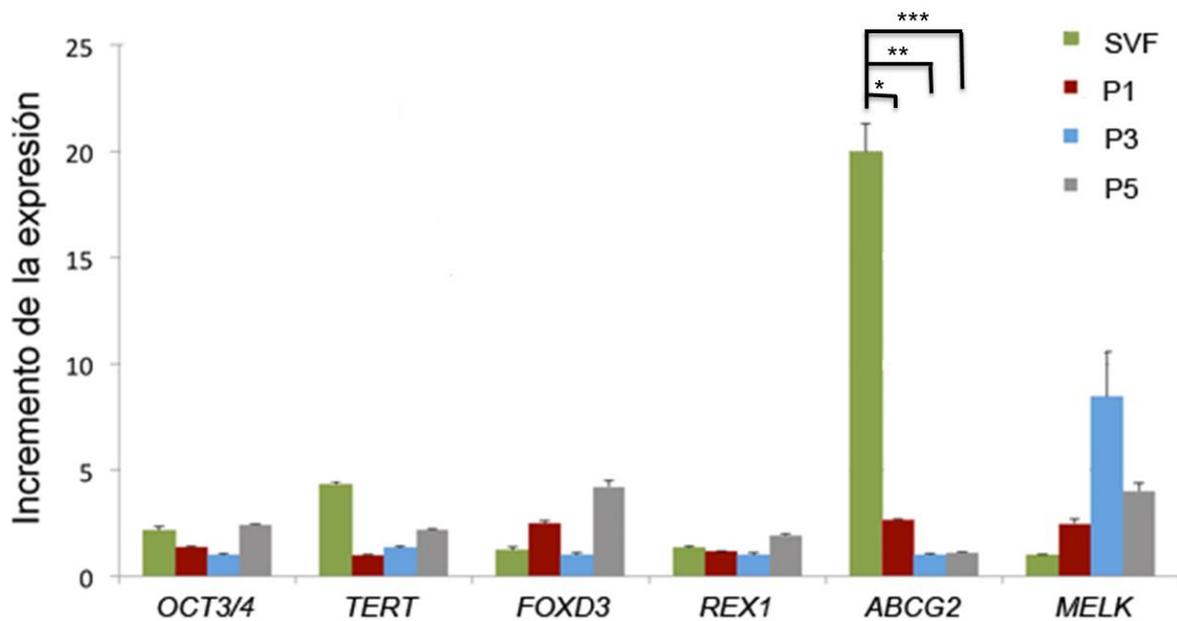


Figura 18: Incremento de la expresión de genes de indiferenciación durante los pases del estudio en el crecimiento de las hASC. Se analizó la expresión de *OCT 3/4*, *TERT*, *FOXD3*, *REX*, *ABCG2* y *MELK* en los 4 pases del estudio, SVF, P1, P3 y P5. El análisis estadístico de la expresión demostró que existía una reducción significativa para el gen ABCG2 desde el momento del aislamiento.

En conclusión, los cambios introducidos mantenían el potencial de indiferenciación de nuestras células y además permitía la purificación de éstas, eliminando los adipocitos maduros y las células con marcadores hematopoyéticos a lo largo del crecimiento y los pases.

V.1.C.i. Caracterización morfológica de las hASC en los diferentes pases

En el pase P1 las células presentaban un cuerpo celular elongado. Sus núcleos tenían una morfología ovalada con numerosos nucleolos muy desarrollados y de apariencia compacta. La cromatina estaba poco condensada, no observándose grumos. El citoplasma celular estaba caracterizado por tener un aspecto granular (Figura 19-A, B); con forma redondeada y distribuidos preferentemente en la región perinuclear. En pase P3 la morfología continuaba siendo fusiforme, pero también pudimos encontrar algunas células con morfología estrellada o poligonal. El núcleo era ligeramente ovalado y en ocasiones irregular con invaginaciones conteniendo nucleolos bien desarrollados y condensados. La cromatina continuaba con un aspecto laxo. Un fenómeno importante a destacar fue la observación de frecuentes células binucleadas. El citoplasma no presentó cambios sustanciales excepto en la aparición de algunas estructuras de apariencia vacuolar. (Figura 19-C, D). En pase P5 los cuerpos celulares eran menos fusiformes y más redondeados, con un núcleo ovalado y caracterizado por una cromatina laxa. Sus nucleolos no tenían el grado de compactación que en los pases anteriores. También se observaron células con dos núcleos. El citoplasma continuó siendo granular, aunque en ocasiones pudieron verse estructuras filamentosas (Figura 19-E, F).

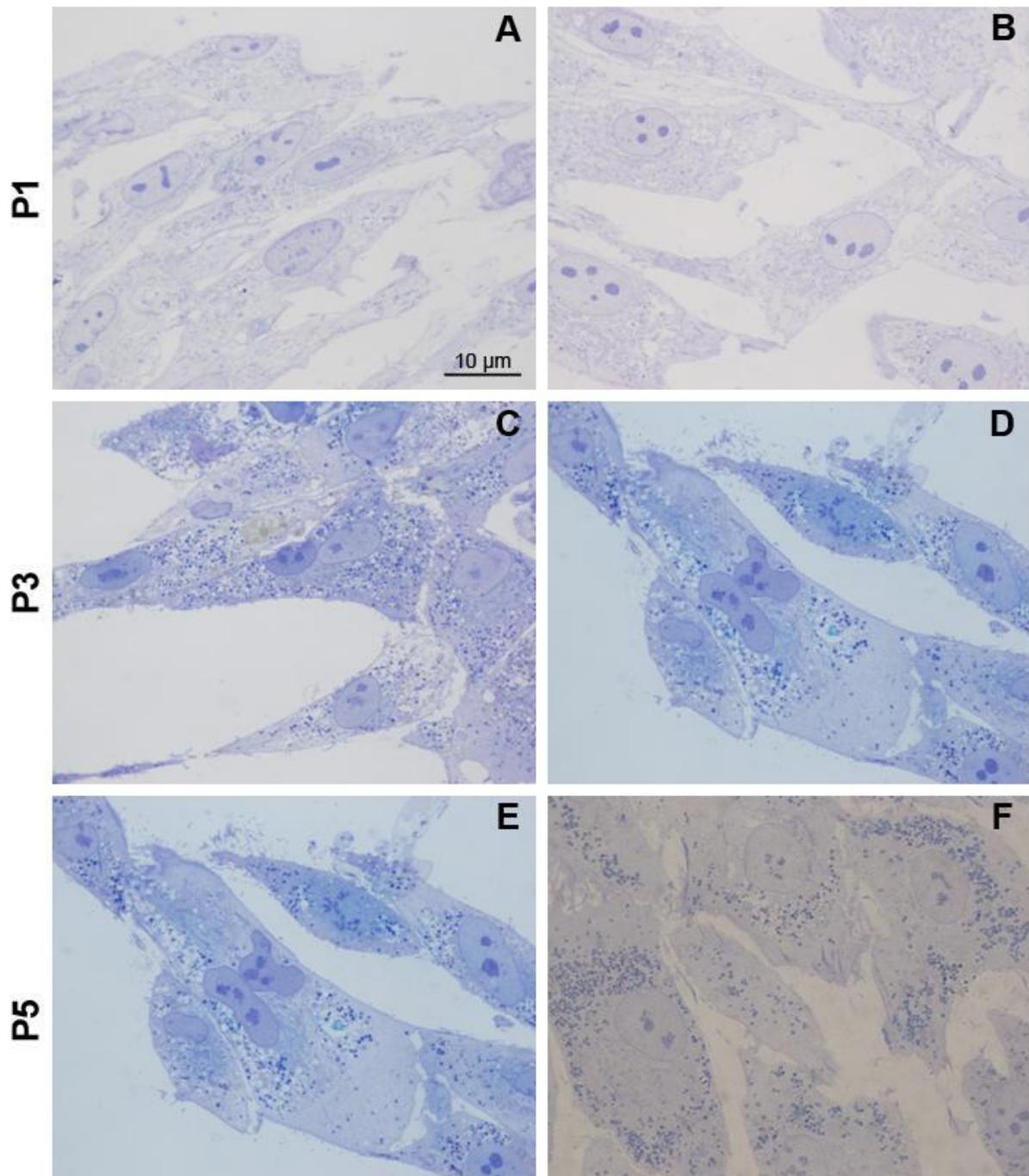


Figura 19: Caracterización morfológica de las células hASC. Secciones semifinas tomadas en el MO. A) y B) Células hASC en pase 1. C) y D) Células hASC en pase 3. E) y F) Células hASC en pase 5. Como puede observarse en todos los casos, las células presentan un aspecto normal sin que existan diferencias significativas en los diferentes pases estudiados.

Para concluir los aspectos morfológicos que se observaron a lo largo de los pases demostraron que no existían cambios significativos con respecto a las poblaciones aisladas empleando procedimientos descritos por otros autores. Tampoco se observaron cambios notables entre los pases P1, P3 y P5.

V.1.C.ii. Análisis del perfil antigénico de las hASC mediante citometría de flujo

La caracterización inmunofenotípica de las hASC se llevó a cabo mediante la citometría de flujo, utilizando dos tipos de marcadores, marcadores de línea mesenquimal y marcadores de línea hematopoyética, para descartar la presencia de células sanguíneas o precursores hematopoyéticos. Todos los anticuerpos utilizados fueron cotejados contra su isotipo para evitar la presencia de falsos positivos y evitar la inmunofluorescencia, ya que ésta estaba presente en nuestras muestras y además variaba entre ellas. Consideramos que la positividad del marcaje implicaba la superación del pico negro (la muestra) parcial o totalmente al pico blanco (isotipo). Como se observa en la Figura 20, las hASC empleadas fueron positivas para los antígenos CD44, CD73, CD90 (Thy-1) y CD166 (ALCAM) (Figura. 209-A). En cambio, los marcadores hematopoyéticos fueron negativos para CD14, CD144 y CD146 (Figura. 20-B) y por ello no existía contaminación de células hematopoyéticas, aunque en el caso de CD45 (Figura. 20-B), existió un 1% de células que mostraba positividad para el marcador. Hay que destacar en estos casos, las muestras marcadas con el anticuerpo mostraban menos inmunofluorescencia que las muestras marcadas con los isotipos, siendo el pico del isotipo (blanco) mayor al pico negro (marcaje).

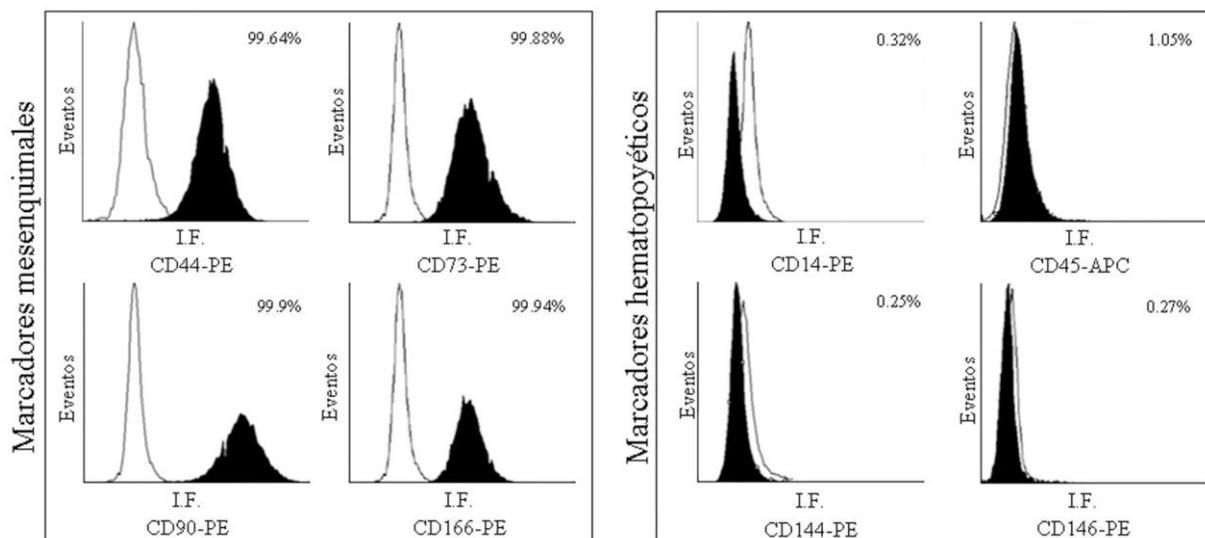


Figura 20: Histogramas de la presencia de antígenos de superficie en hASC analizados mediante citometría de flujo. Se muestra un caso representativo de una población de hASC. En cada histograma se ha representado la intensidad de fluorescencia de los diferentes antígenos marcados con sus correspondientes fluorocromos de la población (pico negro) con sus correspondientes isotipos control (pico blanco) frente a la cantidad de eventos analizados. A) Panel que corresponde a la citometría utilizando los marcadores de linaje mesenquimal. B) Panel que corresponde a la citometría de los marcadores de linaje hematopoyético. Se observa que el método utilizado permite detectar menos del 1% de células con marcaje hematopoyético.

Los resultados de la citometría de flujo muestran que las células hASC obtenidas mediante nuestro protocolo mantienen el perfil antigénico característico de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

V.1.D. Las hASC aisladas mantenían su capacidad multipotente

Para validar el procedimiento, se comprobó que las hASC aisladas mediante nuestro procedimiento, mantenían su capacidad multipotente y evaluamos si ésta había quedado comprometida durante el proceso de aislamiento y mantenimiento. Con este fin, las hASC se cultivaron en medio inductor (o de diferenciación) angiogénico, adipogénico, condrogénico y osteogénico siguiendo un protocolo aceptado y validado por la comunidad científica, el diseñado por Patricia Zuk y cols. en el año 2002.

V.1.D.i. Nuestras hASC se diferenciaron a células que expresan marcadores de endotelio in vitro

La diferenciación de las células ASC se llevó a cabo mediante el mantenimiento y cultivo de éstas en medio inductor angiogénico durante 7 días (Tabla 4). El estudio de las secciones de semifinos demostró que las células diferenciadas eran de menor tamaño y de morfología generalmente más redondeadas que las células control (o cultivadas en medio de mesenquimales), las cuales mantenían una morfología fusiforme. Las células diferenciadas mostraron evidentes invaginaciones nucleares mientras que las células controles presentaron núcleos regulares. No se observaron grandes diferencias en cuanto al aspecto del citoplasma, siendo el contenido muy similar en ambos casos (Figura 21-A, B)

Al ME, el núcleo de las células diferenciadas contenía la cromatina sin formar acúmulos, tampoco se vieron diferencias en cuanto a la forma y densidad de nucleolos ni cambios en la cisterna perinuclear. En el citoplasma se observó la presencia de cuerpos densos laminados que también aparecían en las células cultivadas en medio control, aunque en estas últimas eran mucho más abundantes (Figura 21-C, D). En las células diferenciadas se observó un Retículo Endoplasmático rugoso (REr) muy abundante y en algunos casos dilatado. Otra característica fue la presencia de estructuras filamentosas, las cuales se podían encontrar en las células diferenciadas a endotelio pero no en las controles (Figura 21-E, F). Sin embargo no se observaron los típicos complejos de unión de las células diferenciadas a endotelio, ni estructuras densas de adhesión.

Para averiguar si las células mantenidas en cultivo con medio inductor de diferenciación endotelial expresaban marcadores específicos, se analizó la expresión de *CD31*, *CD34* y *FLK-1* (Ver tabla 3 de cebadores, en el Anexo 3). Tras 7 días de inducción, se observó un aumento de la expresión de *CD34* y *CD31* (Figura 22). *FLK-1* se expresaba en algunos pacientes, aunque en otros la expresión era muy débil. En el caso de las células que crecieron en medio control, todos los marcadores se expresaban aunque la señal detectada era débil. En el análisis de los marcadores de endotelio se introdujo un control positivo de expresión, que correspondía a una línea celular específica de endotelio, las células HUVEC. También se introdujo como control positivo de carga el gen de la B2M (Figura 22)

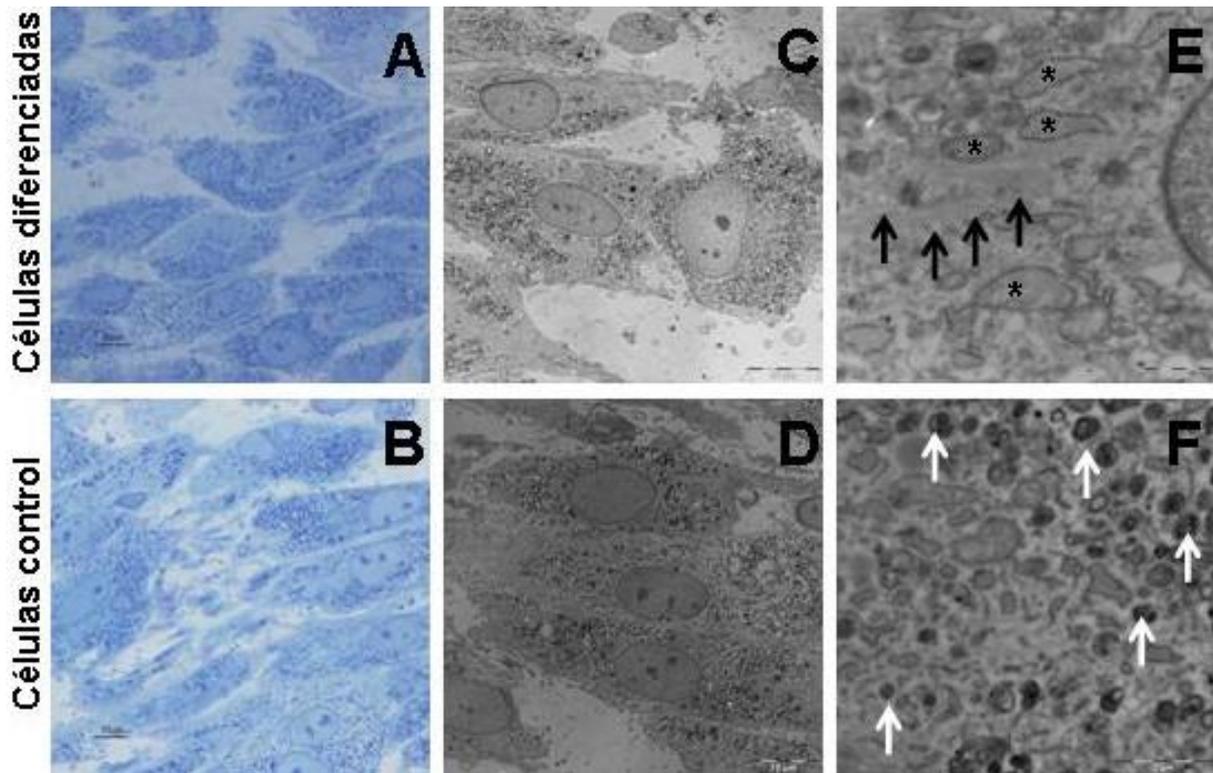


Figura 21: Caracterización morfológica de las células diferenciadas hacia células endoteliales en comparación con las células control. A) Secciones de semifino de células diferenciadas a endotelio. B) Secciones de semifino de células control. C) Secciones de ultrafino de células diferenciadas hacia endotelio. D) Secciones de ultrafino de células control. E) Detalle del REr dilatado (*) y estructuras filamentosas (flechas) en el citoplasma de las células diferenciadas. F) Detalle del citoplasma de células control con abundantes cuerpos densos laminares (flechas).

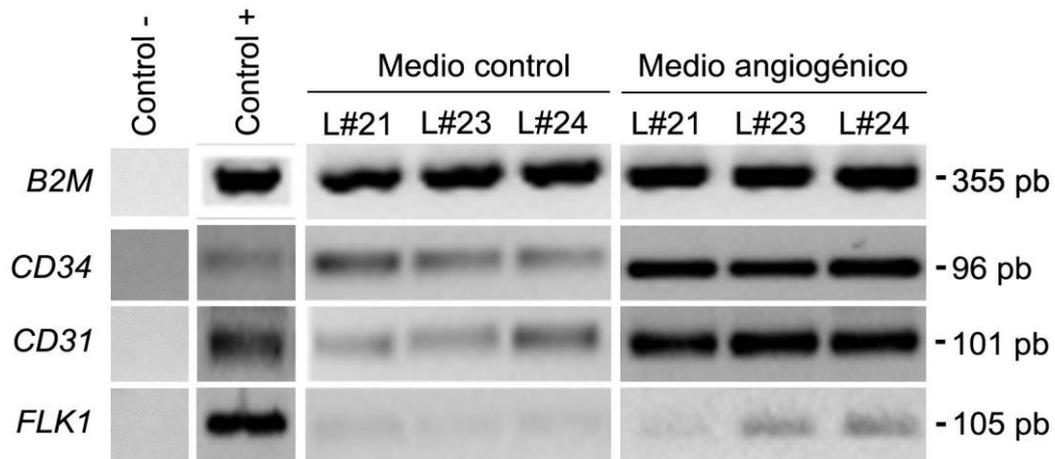


Figura 22: Caracterización molecular para el panel de marcadores de angiogénesis de las muestras diferenciadas hacia endotelio. La Figura incluye las muestras mantenidas en medio de mesenquimales o medio control y las muestras que fueron diferenciadas. Existe un aumento de la expresión de los marcadores endoteliales en las células diferenciadas con respecto a las no diferenciadas. En la Figura se incluye el control interno positivo de carga correspondiente a la B2M (gen de expresión constitutiva), el control positivo (Control +) de expresión de los marcadores (células HUVEC) y el control negativo de no expresión (Control -).

Para comprobar la diferenciación hacia células endoteliales se llevaron a cabo tinción inmunocitoquímica contra el marcador de células endoteliales VWF (en inglés: Von Willebrand Factor). El VWF es una glicoproteína presente en el plasma sanguíneo y producido y secretado por las células endoteliales e involucrada en la coagulación, por ello está considerado un buen marcador de células endoteliales maduras. La inmunocitoquímica contra el VWF (Figura 23) corroboró que la diferenciación se había llevado a cabo con éxito. La señal del VWF se podía apreciar como un marcaje citoplasmático y aparecía como pequeños gránulos fluorescentes que correspondían a los cuerpos de Weibel-Palade (Figura 23-B, -C) apareciendo en algunos casos células que eran negativas para el marcaje (Figura. 23-B). En los cultivos de hASC en medio control (Figura. 23-A) no se encontró ninguna célula que fuera positiva contra el VWF, con lo que se dedujo que no había diferenciación espontánea y que el medio inductor era excelente para la diferenciación endotelial.

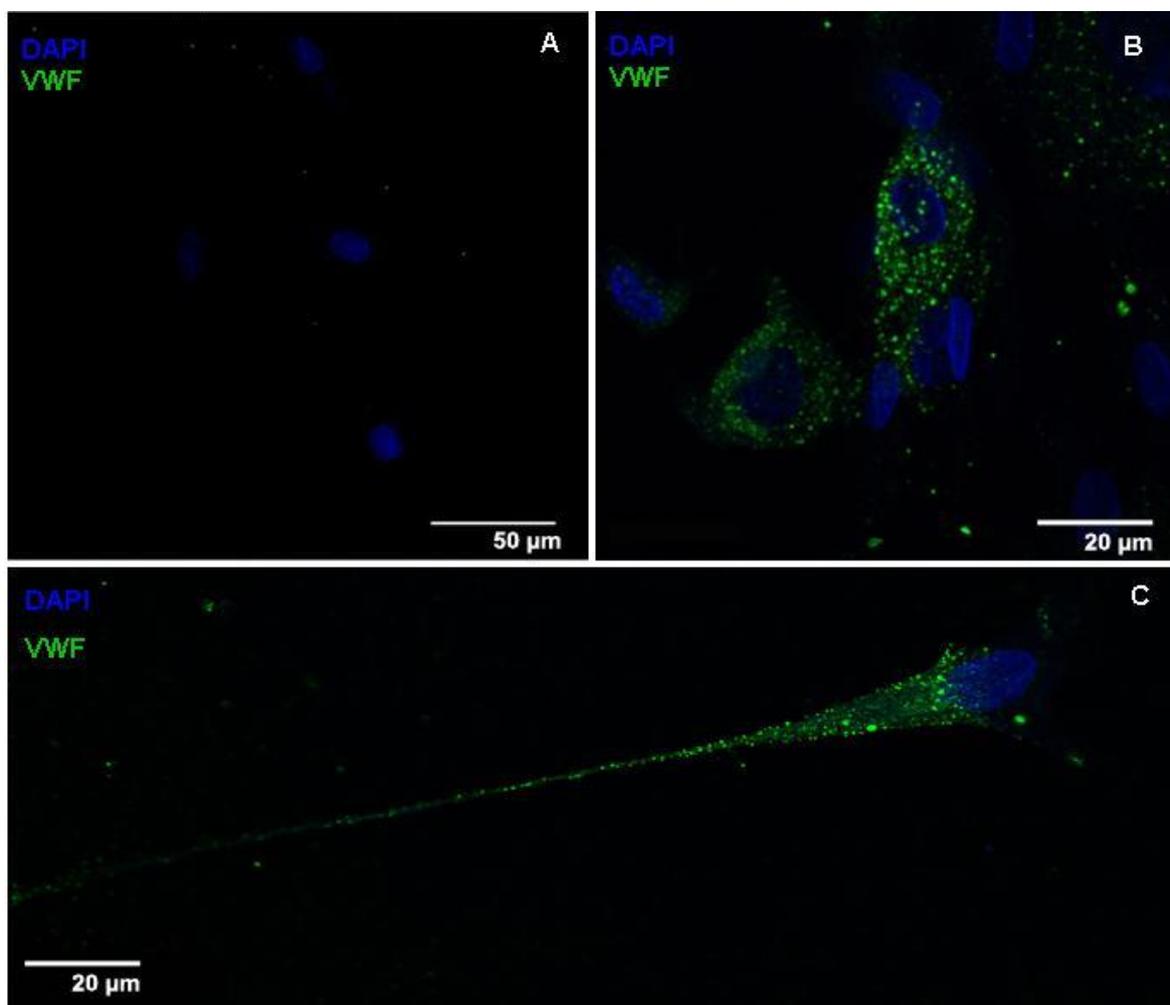


Figura 23: Inmunocitoquímica contra el marcador de células endoteliales VWF. La Figura A corresponde a un cultivo de hASC mantenidas en medio control mientras que las Figuras B y C corresponden a células hASC que fueron cultivadas en medio inductor angiogénico, observándose el típico patrón punteado de la tinción propio de los cuerpos de Weibel-Palade.

Los resultados muestran que las células hASC obtenidas mediante nuestro protocolo de aislamiento mantienen su capacidad para diferenciarse a células endoteliales.

V.1.D.ii. Nuestras hASC se diferenciaban a células que expresaban marcadores adipogénicos In Vitro

La diferenciación a adipocitos a partir de hASC se llevó a cabo empleando el medio descrito en la tabla 4.

Durante el cultivo de las células en diferenciación se pudo distinguir bajo el microscopio de contraste de fases que existía una población heterogénea de células, algunas con morfología fusiforme y otras con morfología irregular. A partir del día 5 de cultivo, se empezaban a apreciar cuerpos refringentes en el interior celular (Figura 24-A). El día 9, estos cuerpos refringentes eran muy numerosos llegando a ocupar en ocasiones todo el espacio intracelular. (Figura 24-B). Posteriormente, mediante la tinción histológica de Oil Red, se evidenció que los cuerpos refringentes correspondían a gotas lipídicas. La eficiencia del protocolo de inducción utilizado no fue del 100%, por lo que no todas las células presentes en el cultivo se diferenciaron a adipocitos. (Figura 24-C). Las células control mantenidas con medio de mesenquimales fueron negativas para la tinción de Oil Red (Figura 24 -D).

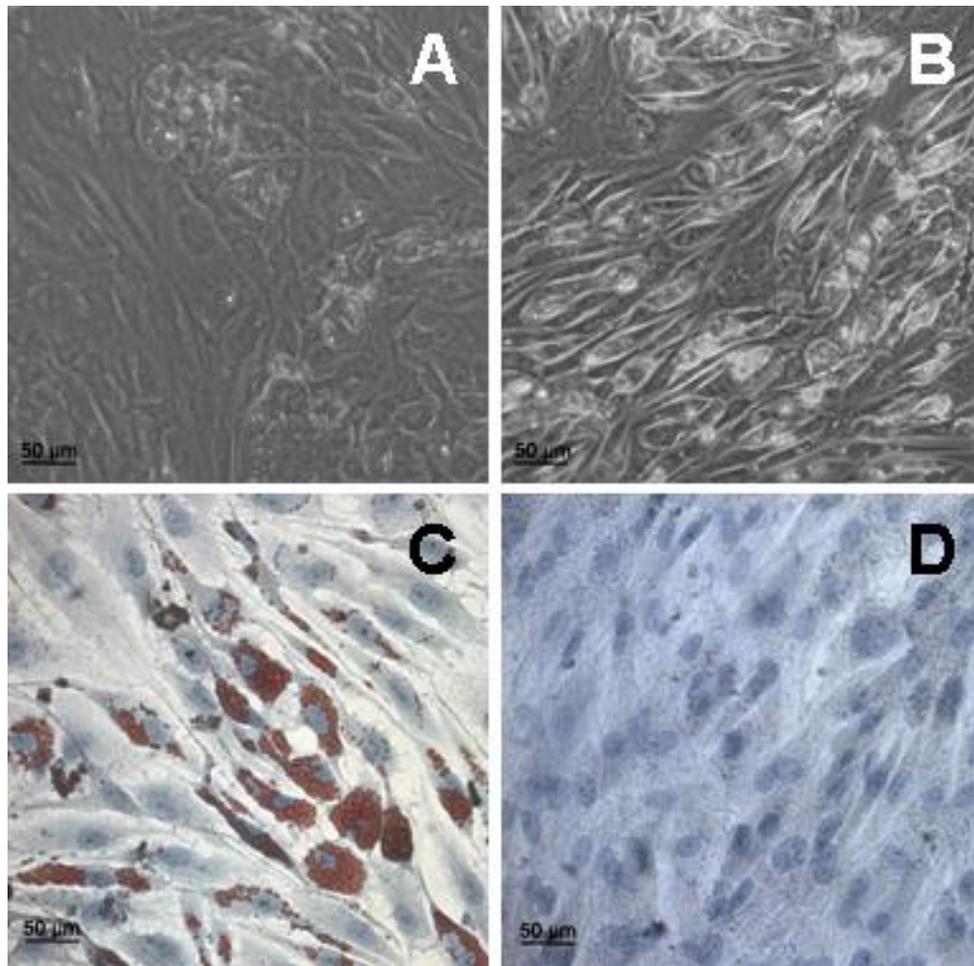


Figura 24: Diferenciación de las ASC a adipocitos. A) Imagen tomada a día 5 de cultivo medio de diferenciación. B) Imagen tomada a día 9 de cultivo en medio de diferenciación. Se observa un aumento de vesículas refringentes. C) Tinción de Oil Red en las células diferenciadas. Existe un aumento de cuerpos vesiculares que corresponden a depósitos de grasa. D) Tinción de Oil-Red en las células control. No se observa cambios en el interior del citoplasma. (Imágenes tomadas en el microscopio de contraste de fases).

El análisis morfológico de las secciones semifinas de las células en cultivo corroboró la presencia de gotas lipídicas, las cuales ocupaban la mayoría del citoplasma libre. Estas células eran más irregulares que sus correspondientes casos control. Poseían un núcleo excéntrico debido al desplazamiento de éste por las gotas lipídicas. También se podían observar células que carecían de gotas lipídicas y en su defecto, su citoplasma contenía gran cantidad de vesículas. Éstas eran fusiformes y su núcleo era grande y centrado. (Figura 25-A). En el caso de las células cultivadas en medio control, mantenían su morfología fusiforme con un núcleo ovalado y un citoplasma muy granuloso (Figura 25 -B).

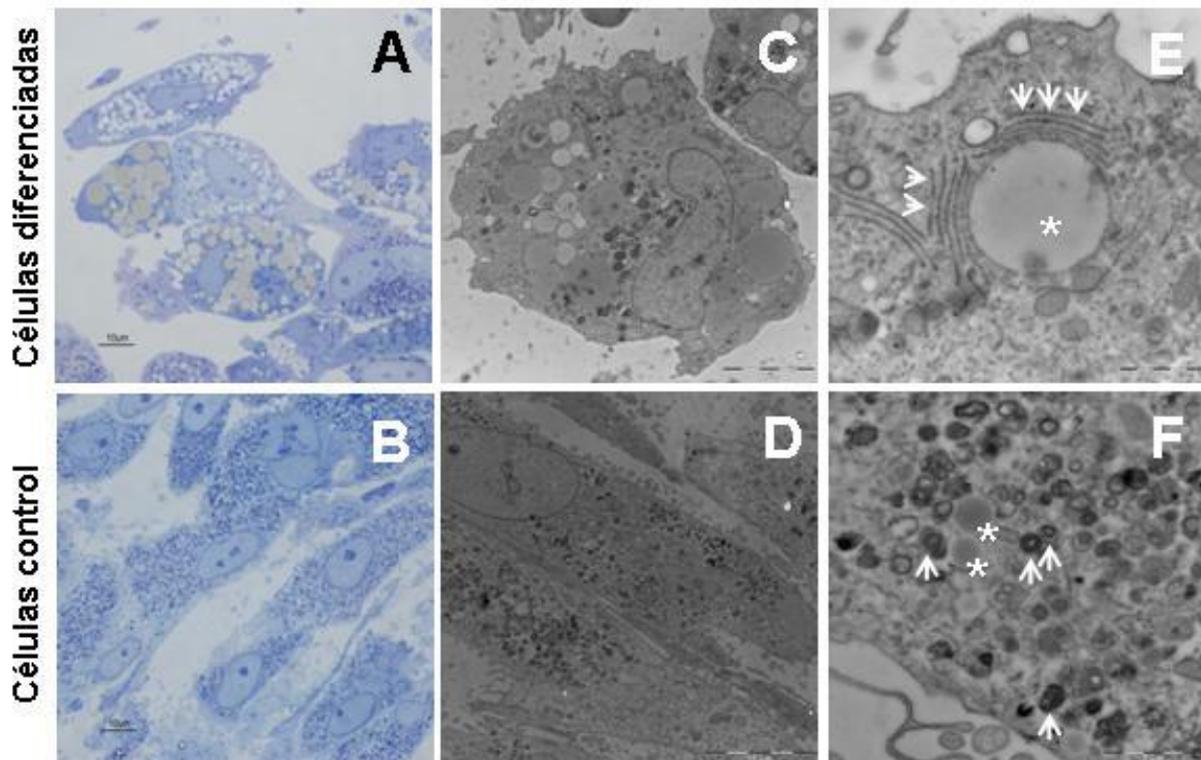


Figura 25: Caracterización morfológica de las células diferenciadas adipocitos en comparación con células control. A) Secciones de semifino de células diferenciadas a adipocitos. B) Secciones de semifino de células control. C) Secciones de ultrafino de células diferenciadas hacia adipocito. D) Secciones de ultrafino de células control. E) Detalle del REr de células diferenciadas rodeando a las gotas lipídicas (*). F) Detalle del citoplasma de control con abundantes cuerpos densos laminares (flechas) y pequeñas gotas lipídicas (*).

Al ME se evidenciaron numerosas diferencias entre las células diferenciadas y las control. Las células diferenciadas eran mucho más pequeñas y redondeadas que las células control, pudiéndose apreciar en su citoplasma grandes gotas lipídicas. Estas estructuras también pudieron observarse en las muestras controles pero su número y tamaño eran mucho más reducidos. El núcleo era periférico e irregular en las diferenciadas, mientras que en los controles el núcleo era ovalado y, en la mayoría de los casos, ocupaba el centro de la célula (Figura 25-C, D). Los cuerpos densos laminares eran abundantes en los controles y no tanto en las diferenciadas. El REr estaba bien desarrollado en las células diferenciadas y en ocasiones aparecían rodeando las gotas lipídicas (Figura 25-E, F). Algunas gotas lipídicas muy pequeñas pudieron apreciarse en las muestras control.

El análisis molecular de los marcadores de grasa (Figura. 26) confirmó la diferenciación de las células mantenidas con medio de diferenciación a adipocitos. Los resultados mostraron que tras la inducción de la diferenciación se producía un aumento en expresión de diferentes genes característicos de adipocitos maduros como LPL, AP2, ADD1, ADIPQ, ADFP, Plin y Lep (Figura. 26). En el caso del PPAR2 se observó una disminución de la expresión tras la inducción del proceso de diferenciación (Figura. 26).

Se introdujeron control positivo de carga (B2M) y control positivo de expresión de marcadores de grasa, obtenido a partir de tejido adiposo de humano.

Cabe destacar que todos los pacientes que se utilizaron para realizar la diferenciación hacia adipocitos parecía que tuvieran el mismo potencial para dar lugar a este tipo celular.

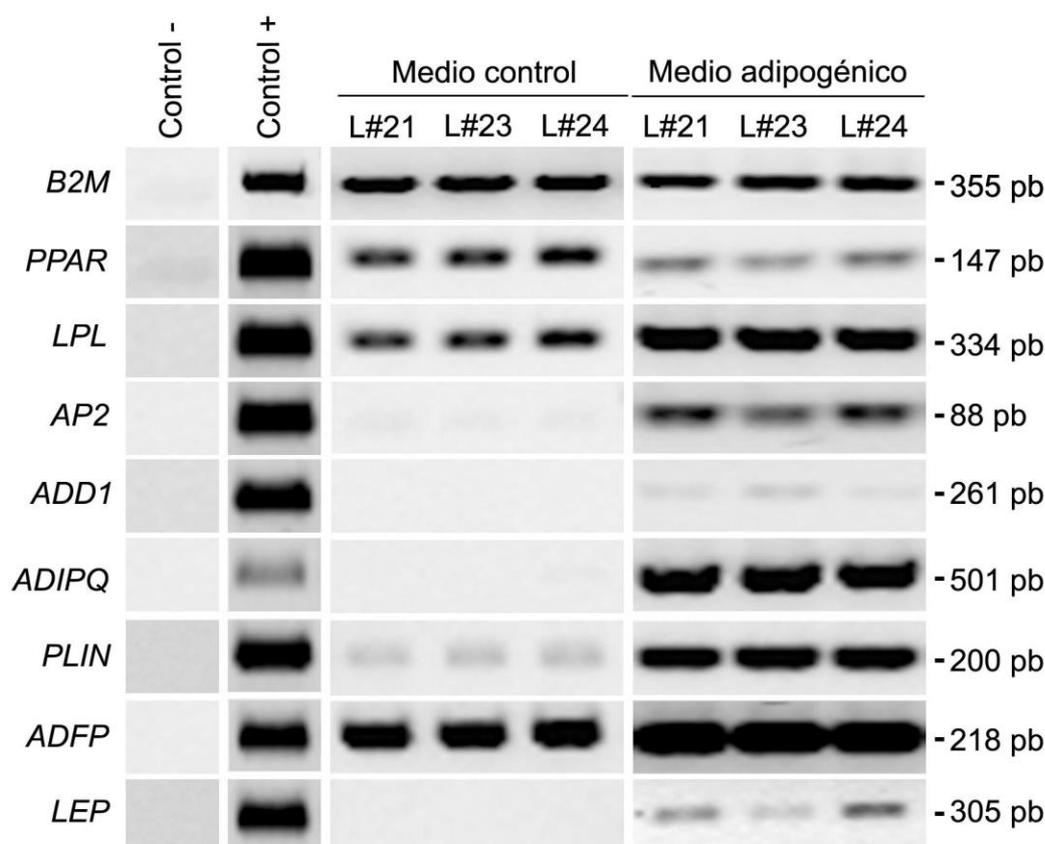


Figura 26: Caracterización molecular de las células adipo-inducidas. En la Figura se muestran representados la expresión de genes considerados propios de genes en muestras mantenidas en medio control y muestras mantenidas en medio de diferenciación. En todos los casos, excepto en PPAR, existe un expresión o un aumento de ésta en aquellas muestras que han sido adipo-inducidas. Se incluye un control negativo de expresión (Control -), el control positivo de expresión de los marcadores (Control +) que corresponde a tejido adiposo y el control interno de carga correspondiente a la B2M (gen de expresión constitutiva).

Los resultados muestran que las células hASC obtenidas mediante nuestro protocolo de aislamiento mantienen su capacidad para diferenciarse a adipocitos.

V.1.D.iii. *Nuestras hASC se diferenciaban a condrocitos In Vitro*

Para demostrar la capacidad de diferenciación a cartílago, tras la inducción con el medio de diferenciación correspondiente (ver tabla 4), las células se fijaron para realizar la tinción de azul alción. Esta tinción confirmó la presencia de proteoglicanos de la matriz extracelular característica del tejido cartilaginoso en los cultivos tratados (Flechas negras) (Figura 27-A, B). Cuando ésta se llevó a cabo empleando las células control el resultado fue negativo. La tinción también se llevó a cabo en células cultivadas en medio control, resultando negativas para la misma (Figura 27-C,D).

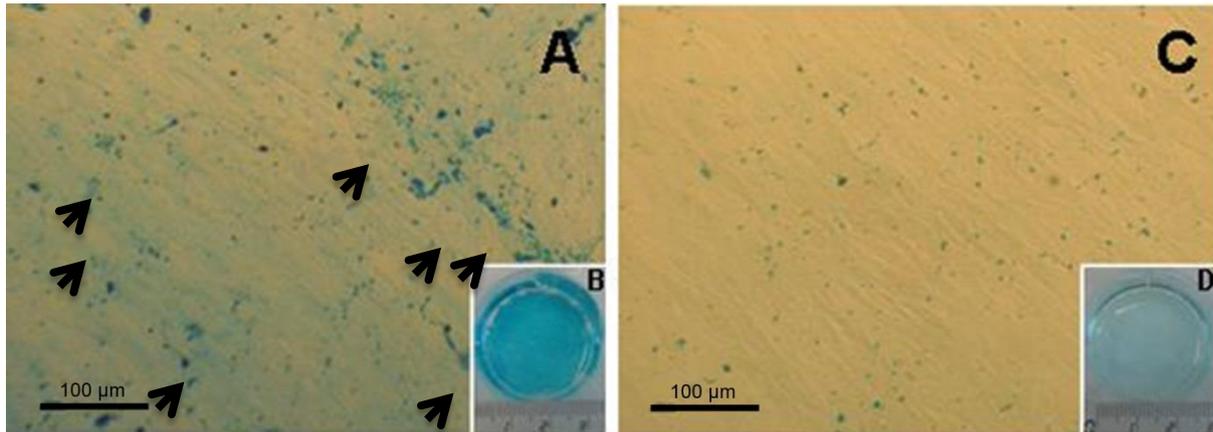


Figura 27: Tinción de Azul Alción de células en cultivo diferenciadas a condrocitos y células control. A) Células diferenciadas a cartílago con depósitos de matriz teñidos de azul (Flechas negras). B) Vista panorámica de la tinción en la placa de cultivo (35 mm de diámetro). C) Células control negativas para la tinción. D) Vista panorámica de la tinción de Azul Alción en el plato de cultivo (35 mm) en las células no diferenciadas. Imágenes A y C tomadas en el microscopio de contraste de fases.

Al llevar a cabo el análisis ultra estructural mediante cortes semifinos, pudo comprobarse que las células diferenciadas tenían una morfología muy elongada con un núcleo excéntrico que generalmente contenía dos nucleolos. También resaltaba la gran cantidad de fibras existentes, que en ocasiones llegaban a formar agregados (Figura 28-A). Por el contrario, las células control mantenían su morfología fusiforme con citoplasma granuloso y sin presencia de fibras (Figura 28-C).

Al ME se pudo apreciar que las células diferenciadas presentaban un núcleo ovalado conteniendo cromatina laxa y, en general, dos nucleolos bien diferenciados. Destacaba la presencia de filamentos del citoesqueleto agrupados en haces (Figura 28-D), mientras que en los casos control los filamentos no eran tan abundantes (Figura 28-F). Además presentaban un REr muy desarrollado y cuerpos densos laminares en el citoplasma (Figura 28-G), al igual que los casos control, aunque en estos últimos eran mucho más numerosos (Figura 28-I). En las células diferenciadas destacaba la gran cantidad de matriz extracelular excretada al medio (Figura 28-J), sin embargo, ésta estaba también presente en los casos control, aunque no era tan abundante (Figura 28-L). En ambos casos, las fibras extracelulares no correspondían a la estriación típica de las fibras de colágeno.

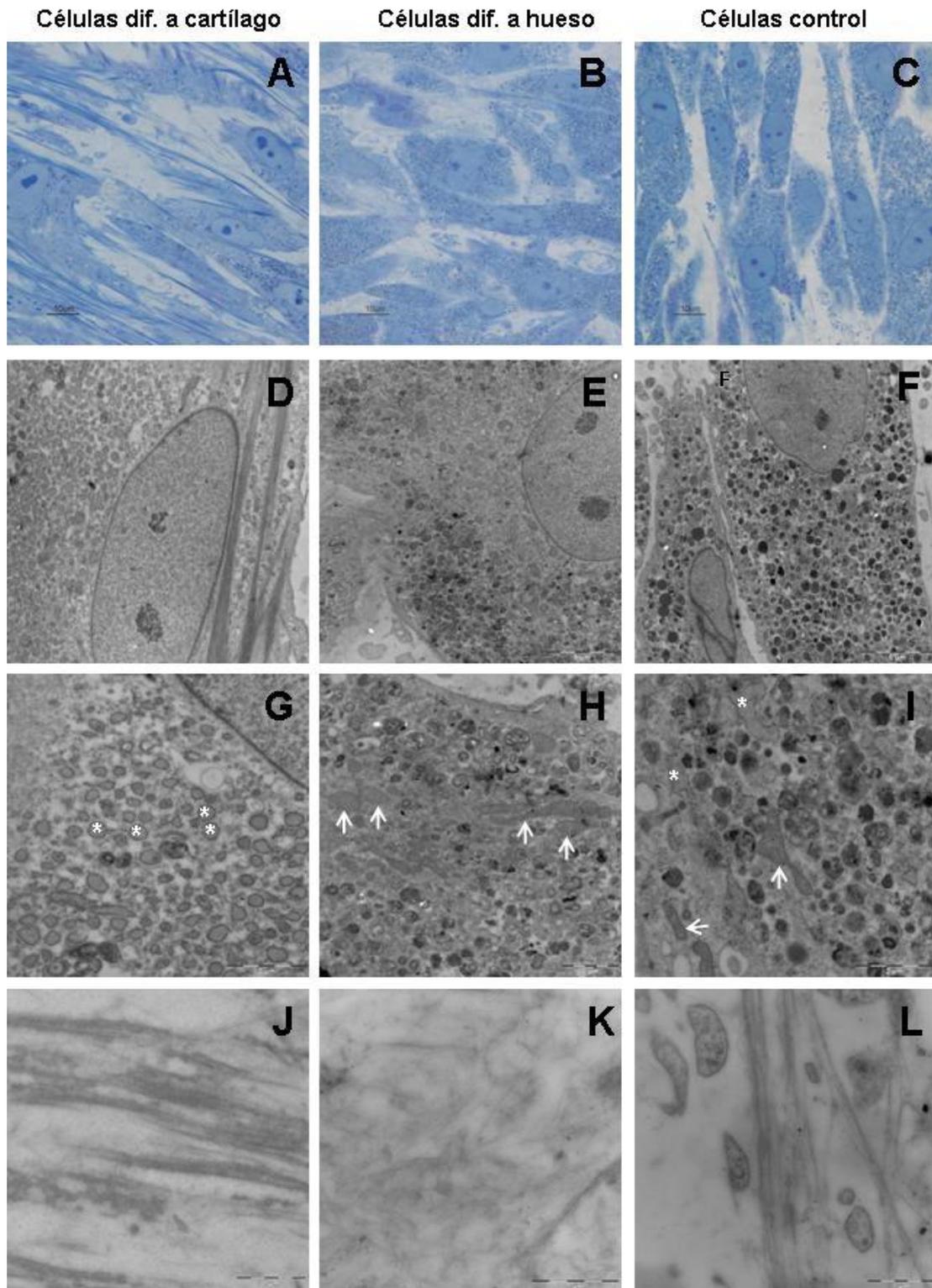


Figura 28: Caracterización morfológica de la diferenciación hacia cartílago y hueso. A) Sección semifina de células diferenciadas a cartílago. B) Sección semifina de células diferenciadas a hueso. C) Sección semifina de células control. D) Imagen al ME de una célula diferenciada a cartílago. E) Imagen al ME de una célula diferenciada a hueso. F) Imagen al ME de una célula control. G) Detalle del citoplasma de las células diferenciadas a cartílago. H) Detalle del citoplasma de las células diferenciadas a hueso. I) Detalle del citoplasma de las células control. J) Detalle de la matriz extracelular de las células diferenciadas a cartílago. K) Detalle de la matriz extracelular de las células diferenciadas a hueso. L) Detalle de la matriz extracelular de las células control. (*: REr, flecha: mitocondria)

Mediante RT-PCR se analizó la expresión de genes propios de la matriz extracelular de cartílago. Se observó expresión de las dos variantes de agrecan, marcador ausente en las células control (Figura. 29). La expresión de CN10 y biglicano (BG) aumentaba claramente en las células sometidas al procedimiento de diferenciación, con respecto a los controles, en los que se expresaban de forma constitutiva. En el caso de la decorina parecía que la expresión tanto de las células mantenidas en medio control como las células mantenidas en medio de diferenciación era la misma. Se introdujeron controles de carga (B2M) y control positivo de expresión de marcadores que correspondía a condrocitos cedidos por el Dr. Manuel Salmeron del UPV. (Figura. 29).

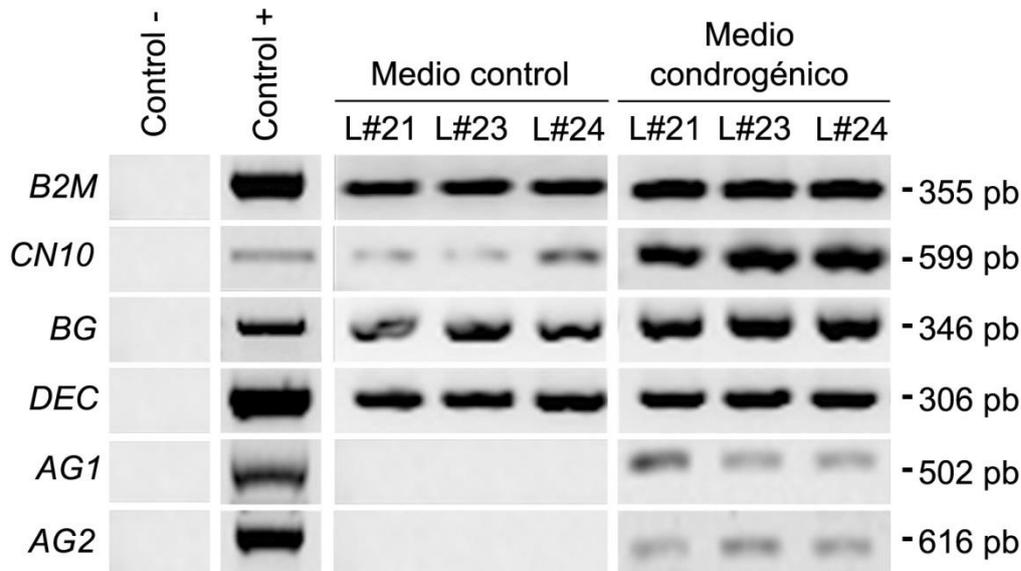


Figura 29: Caracterización molecular del panel de marcadores de cartílago. La imagen muestra la expresión molecular de los marcadores propios de cartílago, tanto para las células diferenciadas a condrocitos, como en las muestras no inducidas (Medio control). El análisis molecular muestra en las muestras inducidas mediante el medio de diferenciación aparece expresión o ésta se aumenta. En la Figura se incluye el control interno de carga correspondiente a la B2M (gen de expresión constitutiva), el control negativo de no expresión (Control -) y el control positivo (condrocitos de humano).

Los resultados sugerían que las células hASC obtenidas conservaban su capacidad para diferenciar a cartílago.

V.1.D.iv. Nuestras hASC se diferenciaban a osteocitos in vitro

La diferenciación hacia hueso, a partir de las células procedentes de LPA fue llevada a cabo empleando un medio inductor de osteogénesis.

La prueba histológica que se realizó para la verificación de la diferenciación a tejido óseo fue la tinción de Von Kossa, que determina la mineralización de la matriz extracelular (Figura. 30-A). En las células diferenciadas se observaron precipitados de plata que correspondían a depósitos de calcio (Figura. 30-A-flechas), mientras que en las células cultivadas en medio control, las deposiciones de calcio no se daba (Figura. 30-B).

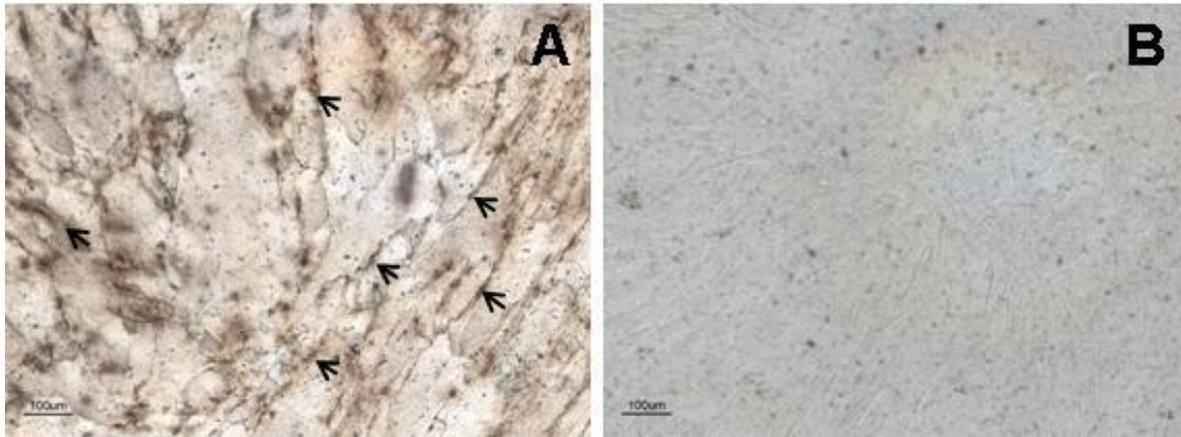


Figura 30: Tinción de Von Kossa para determinar mineralización de la matriz extracelular en células diferenciadas hacia células diferenciadas a hueso y en células control. A) Imagen donde se pueden observar los depósitos de calcio (flechas) en células diferenciadas. B) Imagen de células control negativas para la tinción de Von Kossa. Imágenes tomadas en el microscopio de contraste de fases.

Bajo el microscopio óptico se analizaron las secciones de semifinos concluyendo que las células diferenciadas poseían una morfología muy variable (Figura 28), que comprendía células fusiformes, redondeadas y algunas irregulares. El núcleo era más redondeado que en los casos control, con 2 nucleolos muy condensados y cromatina laxa. El citoplasma era granuloso en todas las morfologías. Destacaba la presencia de una abundante matriz extracelular filamentosa (Figura 28-B). Las células control mantenían una morfología fusiforme con núcleos ovalados, conteniendo nucleolos compactos y cromatina laxa. El contenido citoplásmico continuaba siendo granular (Figura. 28-C).

Al ME fue posible observar como el núcleo de las células diferenciadas a hueso era más redondeado, conteniendo una cromatina laxa y nucleolos condensados (Figura. 28-E), mientras que en los casos control el núcleo se presentaba más alargado (Figura. 28-F). En el citoplasma de las células diferenciadas era posible encontrar numerosas mitocondrias de tamaño mayor que los controles y un REr muy desarrollado (Figura 28-H) el cual estaba muy dilatado en algunos casos ocupando la mayoría del espacio citoplásmico. En las células diferenciadas a hueso podían encontrarse cuerpos densos, pero no tan numerosos ni tan grandes como en los controles (Figura. 28-I). Se pudo observar también como en las células diferenciadas había un proceso de exocitosis activo por la presencia de vesículas que se fusionaban con la membrana plasmática y por la existencia de matriz extracelular (Figura. 28-K), aunque en los casos control la matriz también podía observarse (Figura. 28-L).

Por otro lado, mediante el análisis molecular por RT-PCR se estudió la expresión de genes implicados en la osteogénesis que incluían ON, RXR, VitDR, c-Fos, MSX2, BMP-2, PTHR1, CBF1a, CN1, AP. Podía detectarse una expresión mayor de estos genes en las células osteoinducidas frente a las células control (Figura. 31), aunque también se pudo observar que existía variabilidad entre pacientes para esta diferenciación, ya que no se obtuvo el mismo nivel de expresión en todos los marcadores para todos los pacientes. En el caso de BMP-2 y PTHR1 la expresión era nula en las células cultivadas en el medio control, mientras

que en las cultivadas en el medio osteoinductor existía expresión en algún caso (Figura. 31). Como control interno positivo de carga se introdujo el gen B2M.

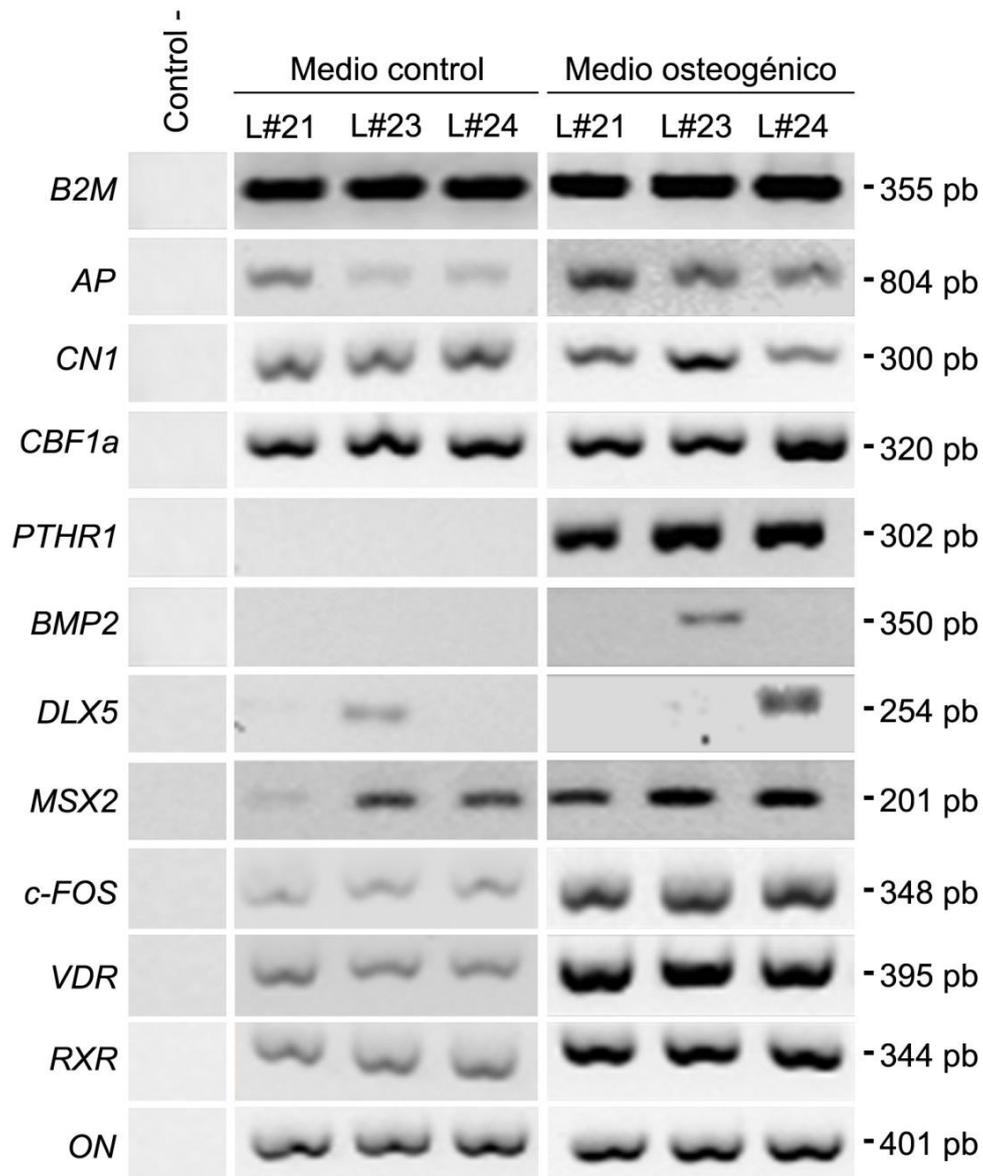


Figura 31: Caracterización molecular de la diferenciación a osteocitos. En la Figura se muestran representados la expresión de genes considerados propios de osteocitos en muestras mantenidas en medio control y muestras mantenidas en medio de diferenciación. El análisis molecular muestra en las muestras inducidas mediante el medio de diferenciación aparece expresión o ésta se ve aumentada. En la Figura se incluye el gen de expresión constitutiva B2M y el control negativo.

Los resultados sugerían que las células hASC tenían capacidad para diferenciar hacia hueso.

V.1.E. Caracterización de la expresión durante los diferentes pases del cultivo de las ASC mediante la utilización de la tecnología de microarray

Con el fin de caracterizar los posibles cambios inducidos por el aumento de la proliferación durante el cultivo con HS, y su posible implicación en las terapias celulares, estudiamos la evolución del perfil de expresión genética de las hASC aisladas y cultivadas mediante nuestro procedimiento, llevamos a cabo un análisis de microarrays durante distintos pases del cultivo (Desde el aislamiento a P5). Este análisis nos permitió comprobar las posibles variaciones de expresión en los cultivos y seguir su evolución.

Los detalles de este análisis se muestran en las Tablas 5-9. Del total de los análisis realizados, nuestra atención se centró en las diferencias de expresión observadas en cada uno de los grupos durante la evolución del cultivo. En primer lugar, se estudiaron los genes que presentaban un aumento de expresión significativa (p -Valor <0.05) también denominados "up-regulados". Como se muestra en la Tabla 6, 63 genes aumentaban su expresión desde el momento de aislamiento hasta pase 1, 111 lo hacían entre pase1 y pase 3 y 209 estaban up-regulados en pase 5 con respecto a pase 3. Al mismo tiempo también se estudiaron los genes que reducían su expresión de un pase a otro, también denominados "down-regulados". En el caso de estos, las diferencias observadas fueron las siguientes:

97 genes entre pase 1 y el momento del aislamiento, 136 disminuyeron su expresión entre pase 3 y pase 1 y 237 mostraron niveles más bajos en pase 5 que en el 3. Estos resultados así como las rutas biológicas en las que están implicados estos genes se muestran con detalle en las tablas 6 , 7 y 8.

Tras estudiar las diferencias de expresión entre los distintos pases, nuestro objetivo fue determinar las relaciones existentes entre los genes encontrados, con el fin de identificar las rutas bioquímicas afectadas y su importancia en las funciones celulares. Para determinar estas relaciones, usamos una plataforma denominada DAVID (Huang da, Sherman et al. 2009). La herramienta KEGG de dicha plataforma, se empleó para establecer el link de los genes previamente identificados y su papel en distintos procesos biológicos que pudieran ser importantes para las hASC. Los genes y las rutas en los que están implicados se muestran en las tablas 5-10. Como se ha mencionado anteriormente, la tabla 6 contiene los genes up-regulados en pase 1 con respecto al momento del aislamiento (SVF). Dichos genes están implicados mayoritariamente en la biosíntesis de ácidos grasos y en la regulación o composición de la matriz extracelular. En el caso de la comparación entre pase 3 y pase 1, al igual que entre pase 5 y pase 3, la mayor parte de los genes regulados al alza participan en funciones relacionadas con metabolismo y ciclo celular.

Tabla 5: Genes regulados al alza entre los pases que están envueltos en rutas KEGG significativas.

Nº de genes		p-valor <0.05	Ruta KEGG	Genes	p-valor
P1 vs G0	63				
			Interacción receptor -ECM	<i>COL 1A2, FNA, SOC1</i>	2.5×10^{-3}
			Biosíntesis ác. grasos no saturados	<i>ELOVL6, FADS1</i>	2.3×10^{-3}
P3 vs P1	111		Metabolismo del piruvato	<i>ACAT2, ALDS1B1, PDHB</i>	1.3×10^{-3}
			Metabolismo butanoato	<i>SMAD2, ANAPC1, CDC16, CDNK2A, ORC4L, TFDP2, E2f5,</i>	1.0×10^{-4}
			Ciclo celular	<i>ACAT2, ALDS1B1, PDHB, GLO1</i>	7.2×10^{-3}
P5 vs P3	209		División celular	<i>BBC3, CHEK1, FAS, THBS1</i>	1.7×10^{-2}
			Ribosoma	<i>MRPL13, RPL22L1, RPS10, RPLP0</i>	1.1×10^{-4}
			Metabolismo del piruvato	<i>ACAT2, ADH7A1, ME1</i>	1.0×10^{-4}
			Reg. Citoesqueleto actina	<i>WASF1, CFL2, FGF2, PFN2, RRAS2</i>	1.1×10^{-4}

Tabla 6. Genes regulados a la baja entre el P1 y el momento del aislamiento que participan en rutas KEGG significativas.

Nº de genes		Ruta KEGG	Genes	p-valor
97	p-valor <0.05			
		Ruta señalización Jak-STAT	<i>EZR, JAM, PIK3R3</i>	1.0×10^{-2}
		Migración transendotelial leucocitaria	<i>ARGDIB, NTRK2, PIK3R3</i>	1.2×10^{-2}
		Señalización Neurotrofina	<i>IFNGR1, PIK3R3, SPRY1</i>	2.7×10^{-3}

Tabla 7: Genes regulados a la baja entre el P3 y el P1 que participan en rutas KEGG significativas.

Nº de genes p-valor <0.05	Ruta KEGG	Genes	p-valor
136	Señalización Neurotrofina	<i>PLG2, NTRK2, NFKB1, PIK3R3, ARHGDI3</i>	2.1×10^{-3}
	Señalización celular en epitelio infectado de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>PLCG2, HBEGF, NFKB1, JAM2</i>	1.5×10^{-3}
	Miocarditis viral	<i>HLA-DRB1, FYN, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	1.8×10^{-3}
	Moléculas de adhesión celular (CAM)	<i>HLA-DRB1, CD34, JAM2, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	2.8×10^{-3}
	Asma	<i>HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	1.2×10^{-3}
	Presentación de antígeno	<i>HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DQA1, B2M</i>	3.2×10^{-3}
	Células de linaje hematopoyético	<i>IL1R1, HLA-DRB1, CD34, CD14</i>	3.6×10^{-3}
	Ruta de señalización ErbB	<i>PLCG2, HBEGF, PIK3R3, NRG2</i>	3.8×10^{-3}
	Rechazo de alotransplantes	<i>HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	2.3×10^{-3}
	Enfermedad injerto contra huésped	<i>HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DQA1c</i>	2.9×10^{-3}
	Diabetes mellitus tipo 1	<i>HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	3.6×10^{-3}
	Red inmunológica intestinal de producción de IgB	<i>HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	5.6×10^{-3}
	Enfermedad tiroidea autoinmune	<i>HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	6.3×10^{-3}
	Migración transendotelial leucocitaria	<i>EZR, PLCG2, PIK3R3, JAM2</i>	1.1×10^{-2}
	Infección <i>Escherichia coli</i>	<i>EZR, FYB, CD14</i>	8.5×10^{-3}
	Ruta de señalización adipocitocinas	<i>NFKB1, POMC, CAMKK2</i>	1.3×10^{-2}
	Cascada de coagulación	<i>VWF, F13A1, CFH</i>	1.4×10^{-2}

Tabla 8: Genes regulados a la baja entre el P5 y el P3 que participan en rutas KEGG significativas.

Nº de genes p-valor <0.05	Ruta KEGG	Genes	p-valor
237	Moléculas de adhesión celular (CAM)	<i>ITGA9, PTPRM, HLA-DRB1, CD34, CLDN5, HLA-DRB5, HLA-DPB1, JAM2, HLA-DMA, HLA-DQA1, HLA-F</i>	5.5×10^{-7}
	Rechazo de alotransplantes	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, GZMB, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1, HLA-F</i>	2.2×10^{-7}
	Enfermedad injerto contra huésped	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, GZMB, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1, HLA-F</i>	4.0×10^{-7}
	Diabetes mellitus tipo 1	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, GZMB, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1, HLA-F</i>	6.8×10^{-7}
	Asma	<i>HLA-DRB1, IL13, HLA-DRB5, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	1.2×10^{-6}
	Enfermedad tiroidea autoinmune	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, GZMB, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1, HLA-F</i>	2.7×10^{-6}
	Presentación de antígeno	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1, B2M, HLA-F</i>	7.0×10^{-5}
	Linaje celular hematopoyético	<i>IL1R2, HLA-DRB1, CD34, CD33, HLA-DRB5, EPOR, CD14</i>	8.8×10^{-5}
	Miocarditis viral	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1, HLA-F</i>	2.4×10^{-4}
	Red intestinal autoinmune para la producción de IgA	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1</i>	3.4×10^{-4}
	Lupus sistémico eritematoso	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DQA1,</i>	7.8×10^{-3}
	Ruta de señalización Jak-STAT	<i>SPRY1, IL10RA, STAT5A, IL13, EPOR, PIK3R3</i>	1.3×10^{-2}
	Reabsorción de Sodio regulado por aldosterona	<i>HSD11B2, IGF1, PIK3R3</i>	1.4×10^{-2}
	Ruta de señalización ErbB	<i>STAT5A, HBEGF, PIK3R3, NRG2</i>	2.3×10^{-2}

Tabla 9: Genes que presentan cambios en la expresión que participan en rutas KEGG significativas.

Nº de genes p-valor <0.05	Ruta KEGG	Genes	p-valor
62	Ruta señalización Jak-STAT	<i>EZR, JAM, PIK3R3</i>	1.0×10^{-2}

En el caso de los genes “down-regulados”, las diferencias afectaban a genes envueltos en rutas de migración (en el caso de pase 1 y aislamiento) e inmunomodulación en el caso de cultivos más evolucionados. Además, el uso del paquete de análisis Ingenuity Core, nos permitió agrupar tanto los genes up-regulados como los down-regulados en dos grupos y establecer todas las relaciones entre cada uno de los genes pertenecientes a cada grupo Figuras 32 y 33.

La agrupación correspondiente a los genes up-regulados (Figura 32), reveló que los más expresados eran FN1, FGF2, RRAS2, PFN2, SDC1, RPLP0, CHEK1, FAS, WASF1 y GLO. Estos genes intervienen en varios procesos celulares, pero mediante el uso de Ingenuity, se pudo deducir que el papel que desempeñaban en nuestras células era la regulación del citoesqueleto, la interacción de la matriz extracelular con otras proteínas, división celular y ribosomas. En el caso de los genes down-regulados (Figura. 33), los más afectados fueron HBEGF, FYN, PIK3R3, EZR, PI3K, IGF1, STAT5A, GZMB, NFKB1, NFKB, IL13, CD14, EPOR, HLA-F, B2M, PLCG2, F13A1, IL1R2, IFNGR1, HLA-DRB1 e IL10RA. El gráfico de relaciones que pudo establecerse entre estos genes demostró que estaban implicados en funciones como adhesión celular, linaje hematopoyético, migración leucocitaria o proteínas del complemento y coagulación.

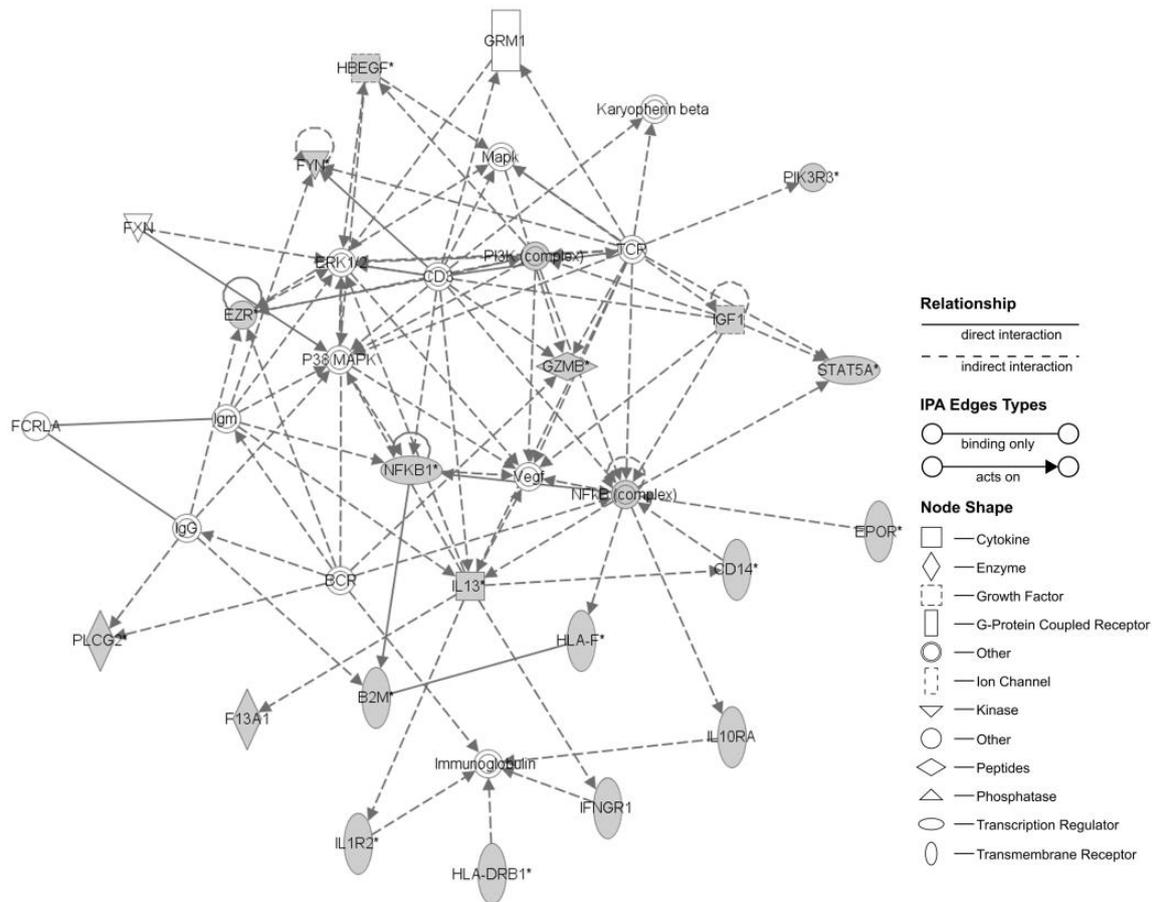


Figura 32: Red resultante del análisis realizado con IPA utilizando genes regulados al alza para un p-valor (BH<0.05).

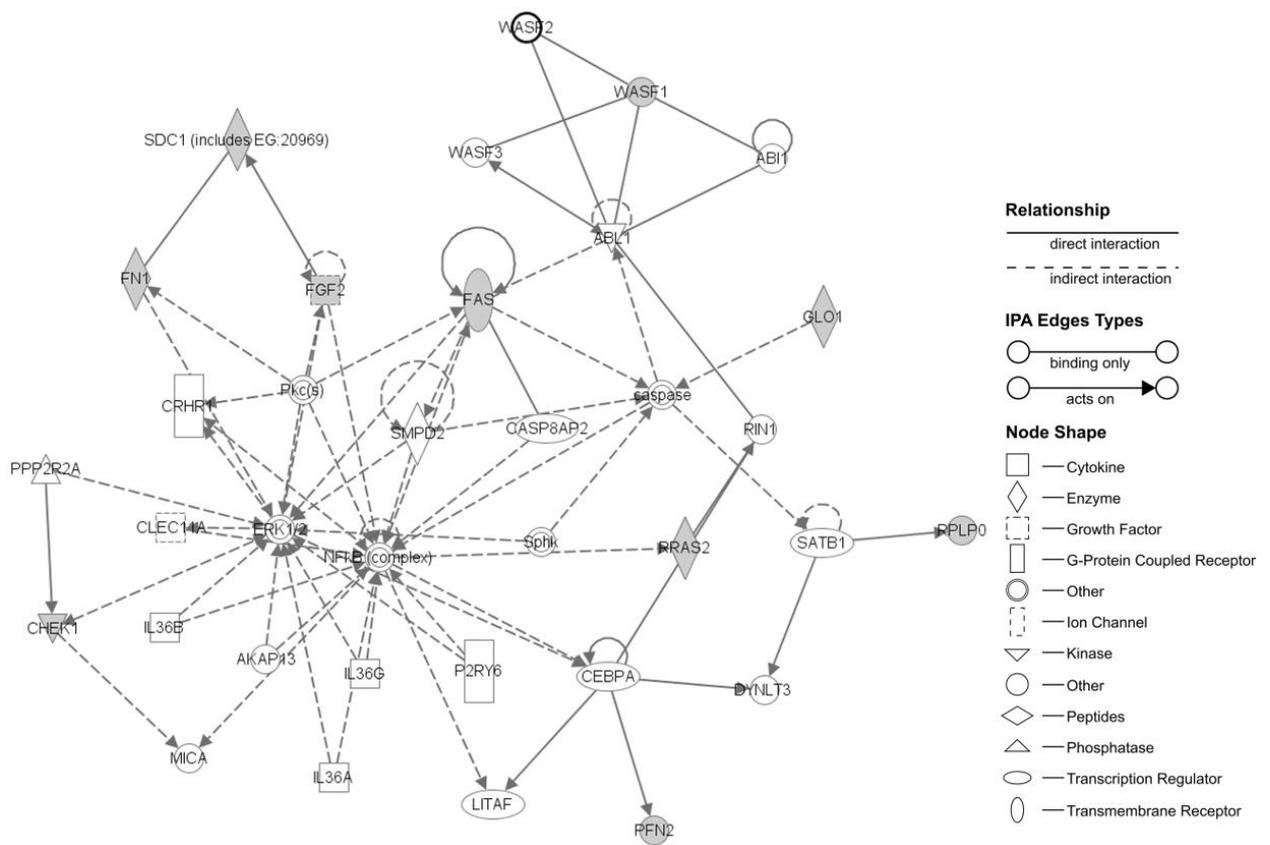


Figura 33 Red resultante del análisis realizado con IPA utilizando genes regulados a la baja para un p-valor ($BH < 0.05$).

V.2. OBJETIVO II. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS SUBPOBLACIONES PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE hASC

V.2.A. Aislamiento de células ABCG2⁺

El transportador ABCG2, además de estar presente en diversos tipos de cáncer (Noguchi, Katayama et al. 2009), puede también expresarse en tejidos sanos (Doyle, Yang et al. 1998, Fetsch, Abati et al. 2006) o e células madre (Zhou, Schuetz et al. 2001, van Herwaarden and Schinkel 2006). Durante los ensayos de microarray, se detectó la expresión de ABCG2 en las muestras de hASC. Por ese motivo fue uno de los marcadores elegidos para intentar aislar subpoblaciones más indiferenciadas en las hASC en pases 1 y 3. Las muestras se levantaron en las condiciones descritas en el apartado de material y métodos. En primer lugar, se preparó un control celular teñido con el isotipo correspondiente, para descartar así la zona de ruido de fondo. El área correspondiente a las hASC (R1), se acotó mediante el análisis de su complejidad y tamaño (Figura 34-A). Una vez determinada la zona donde se encontraban las células, se procedió a delimitar la zona correspondiente a células ABCG2⁺ (R4) y ABCG2⁻ (R5) (Figura 34-B). Teniendo en cuenta el perfil de fluorescencia correspondiente al isotipo (Figura 34-C), se procedió a aislar la fracción marcada para ABCG2 (Figura 34-D).

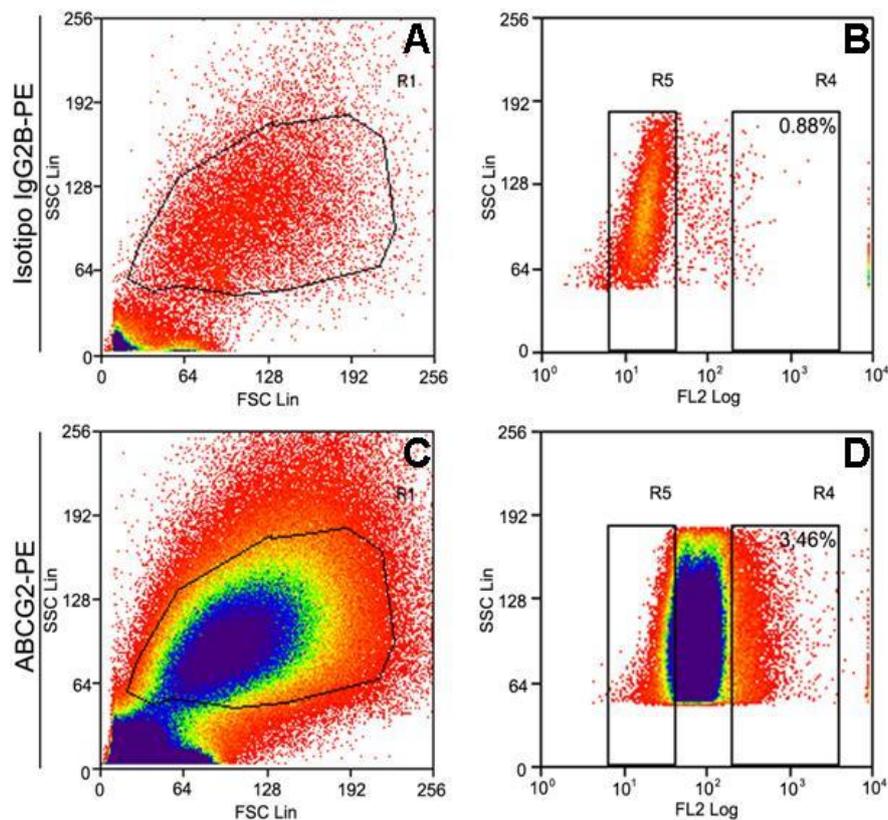


Figura 34: Separación mediante Cell- Sorting de la población ABCG2⁺. El análisis previo de la morfología celular (A) y el isotipo (B) permitió la separación de la población celular total (C) en la población positiva (R4) y negativa (R5) para al ABCG2 (D).

V.2.A.i. Variabilidad de las muestras aisladas para ABCG2

Un total de 7 muestras se sometieron al aislamiento de la población ABCG2 positiva. La variabilidad entre las muestras en cuanto a su contenido en células positivas era elevada, pudiendo encontrar pacientes que prácticamente no tenían células ABCG2⁺ (en el caso del paciente L#92 que contenía un porcentaje de 2 % aproximadamente o el paciente L#93 que contenía un 0.28% de población positiva) o bien pacientes como el caso del L#57 que contenían un 10% de células ABCG2⁺. En general el porcentaje de células positivas se mantenía alrededor del 3.5 %. Aun así, se obtuvieron células ABCG2⁺ suficientes para realizar ensayos de expresión molecular y estudios morfológicos (Figura. 35).

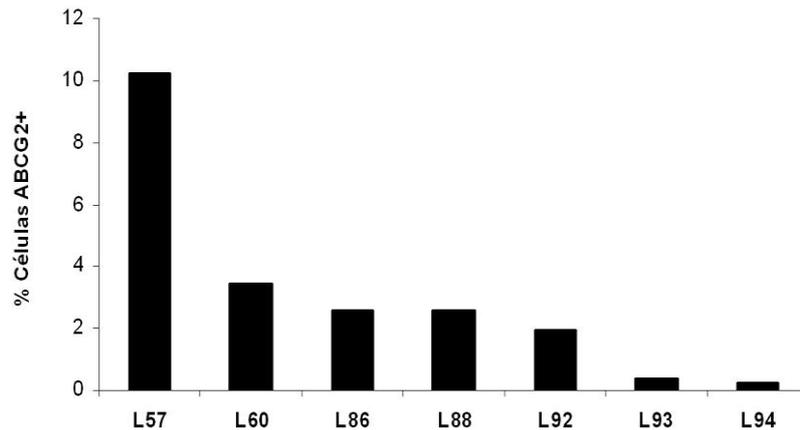


Figura 35: Porcentajes de las células ABCG2⁺ aisladas mediante la técnica del Cell-Sorting en diferentes pacientes. Destaca que la presencia de células ABCG2⁺ en los pacientes era muy variable.

V.2.A.ii. Verificación del enriquecimiento de la población ABCG2⁺

Finalizado el aislamiento de la población ABCG2⁺ y ABCG2⁻ se procedió a la extracción de ARN y posterior RT-PCR, para confirmar la correcta separación. Como se muestra en la Figura 36, el aislamiento de la población ABCG2⁺ fue bastante eficiente, existiendo una expresión muy leve de ABCG2 en la población negativa. Como gen de expresión constitutiva se utilizó B2M.

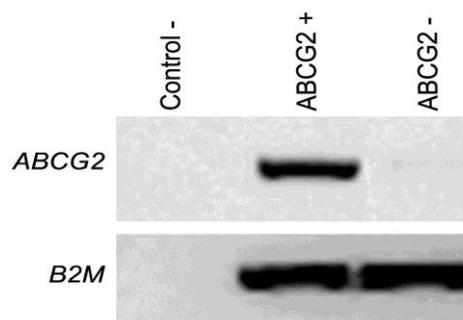


Figura 36: Verificación del correcto aislamiento de la población ABCG2⁺ en las muestras aisladas. Análisis de la expresión de ABCG2 en la fracción positiva y en la fracción negativa de la muestra aisladas mediante Cell- Sorting. Se observa que el aislamiento fue correcto, aunque se puede apreciar una leve banda de expresión de ABCG2 en la población negativa. En la Figura se incluye el control interno de carga correspondiente a la B2M (gen de expresión constitutiva) y el control negativo de no expresión (Control -).

Una vez efectuada la separación celular de las fracciones ABCG2⁺ y ABCG2⁻, parte de las células obtenidas se sembraron en placas de cultivo para permitir su crecimiento. Una semana después de la siembra, se llevó a cabo una tinción de dichos cultivos con el anticuerpo contra ABCG2, para comprobar si en estas condiciones de cultivo permitían el mantenimiento de su pureza o inducían algún tipo de diferenciación. Como puede apreciarse en la figura 37, las condiciones de cultivo eran óptimas para el mantenimiento de la población celular aislada.

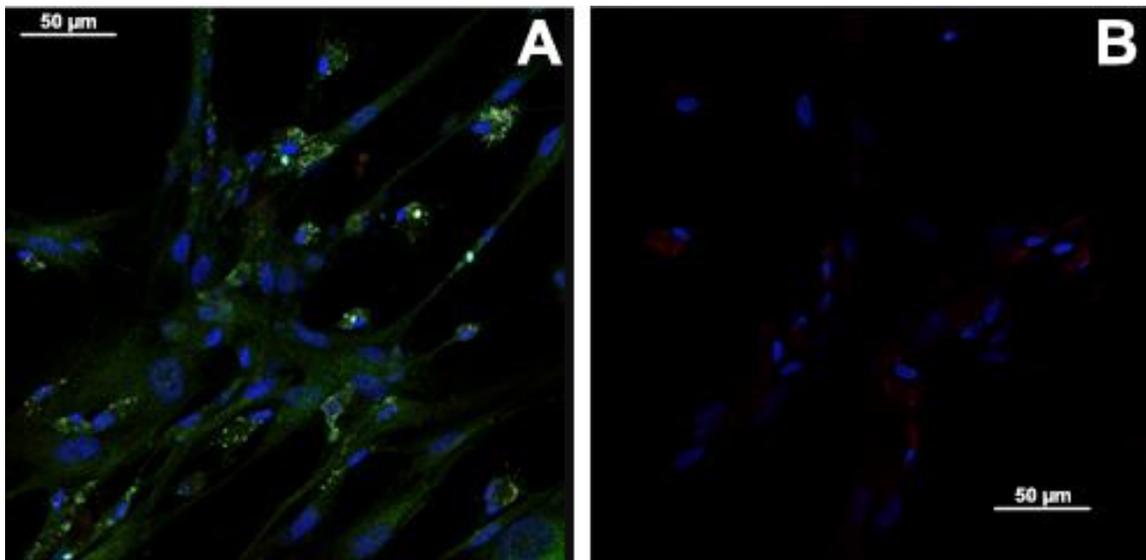


Figura 37: Inmunocitoquímica frente al transportador ABCG2 en las poblaciones aisladas. A) Células ABCG2⁺ marcadas con un anticuerpo FITC. B). Células ABCG2⁻ correspondientes al mismo donante.

V.2.A.iii. Caracterización morfológica de las poblaciones ABCG2

Tras la separación, las células obtenidas se sembraron, para estudiar su morfología.

En cultivo, las células ABCG2⁺ (Figura 38-A) presentaban una morfología redondeada y refringente, y crecían en colonias, mientras que las células ABCG2⁻ eran fusiformes y crecían extendidas, ocupando todo el espacio del plato de cultivo (Figura 38-B).

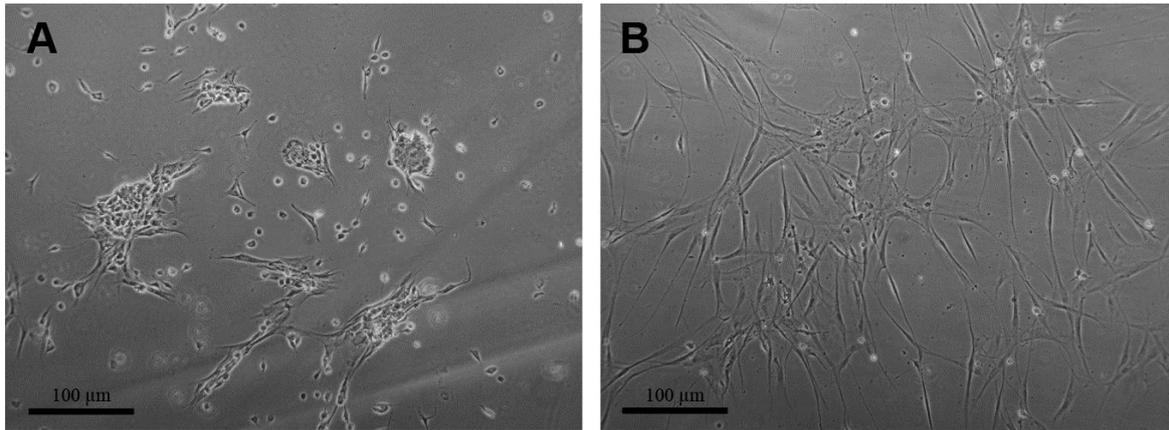


Figura 38: Cultivos de las células separadas mediante ABCG2. A) Imagen en campo claro de células ABCG2⁺ mantenidas en cultivo durante 24h con una morfología redondeada. B) Imagen en campo claro de células ABCG2⁻ en cultivo, que poseían una morfología fusiforme y de mayor tamaño. Después de 4 días, los cultivos se fijaron e incluyeron para estudiar su ultraestructura. Imágenes tomadas en microscopio de contraste de fases.

El estudio morfológico reveló que las células ABCG2⁺ presentaban unos núcleos ovalados que contenían dos o más nucleolos poco densos. Al ME pudimos observar que la cromatina que contenía el núcleo era laxa, no existiendo grumos de cromatina y su citoplasma contenía un RER poco desarrollado, encerrando un material electrodensito, dictiosomas y polirribosomas próximos al núcleo (Figura. 39-B). El contenido citoplasmático presentaba algunas vacuolas y también cuerpos densos que se localizaban principalmente en los alrededores del núcleo (Figura. 39-A). Las mitocondrias (asteriscos blancos, Figura. 39-C) que pudimos observar poseían crestas muy abundantes. Existían a su vez cuerpos densos y haces de filamentos, sin embargo nos llamó la atención la ausencia de gotas lipídicas en estas células. Pudimos observar también la formación de complejos de unión (flecha gruesa negra), muy típicos de epitelio y también la presencia de uniones intercelulares (flecha gruesa blanca).

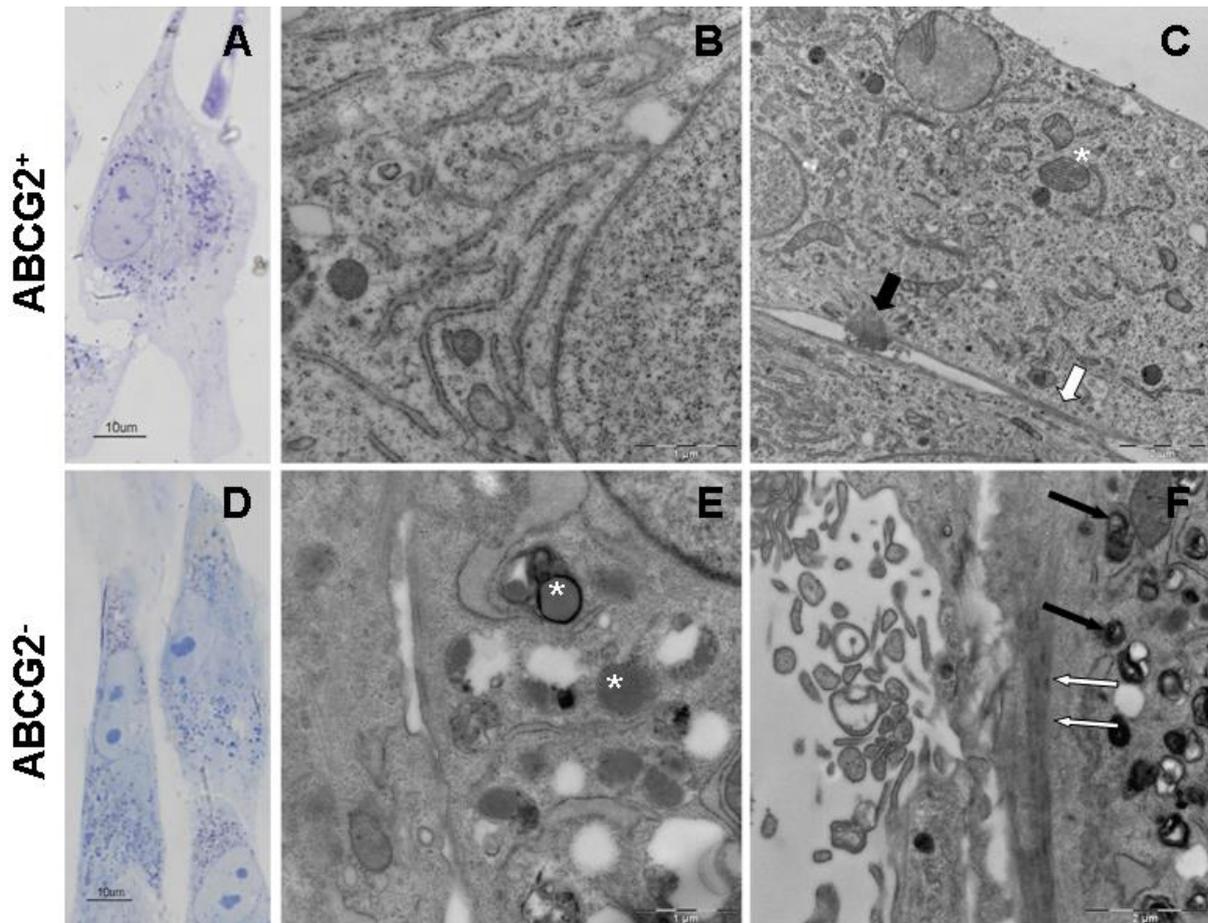


Figura. 39: Estudio de la morfología de la población ABCG2⁺ y ABCG2⁻. A) Semifino de la fracción ABCG2⁺. B y C) Secciones ultrafinas de fracción ABCG2⁺. Los asteriscos blancos muestran las mitocondrias grandes y con crestas muy desarrolladas, mientras que la flecha gruesa negra muestra una posible formación de complejos de unión, y la flecha gruesa blanca indica un complejo de unión. D) Sección semifino de la fracción ABCG2⁻. E y F) Secciones ultrafinas de fracción ABCG2⁻. Los asteriscos blancos indican las gotas lipídicas. Las flechas delgadas negras muestran los cuerpos densos citoplasmáticos, y la flecha delgada blanca los haces de filamentos de actina (fibras de estrés).

Las células ABCG2⁻ aparecían con una forma preferentemente fusiforme, núcleo ovalado y con cromatina laxa, conteniendo dos o más nucleolos más desarrollados que la población ABCG2⁺. El citoplasma presentaba mayor número de orgánulos que la población positiva y mayor número de cuerpos densos que se distribuían por todo el citoplasma (Figura. 39-D). Al ME, los núcleos presentaban cromatina laxa y en su citoplasma existían mitocondrias alargadas, de menor tamaño que las anteriores. El RER continuaba siendo abundante y en algunos casos aparecía dilatado. El contenido en gotas lipídicas (asterisco blanco, Figura 39-D) y en cuerpos densos (flecha negra delgada, Figura 38-E) eran considerablemente mayor que en la población positiva. En los extremos celulares se podían observar la presencia de una red de fibras de estrés que se agrupaban en haces (flechas blancas delgadas, Figura 39-E).

V.2.A.iv. Caracterización molecular de las células separadas mediante ABCG2

El análisis molecular se llevó a cabo mediante RT-PCR de las células aisladas en el Cell-Sorting. Como puede apreciarse en la Figura. 40-A, las células ABCG2⁻ presentaban mayor expresión de ADFP, ADPN o PLIN. La naturaleza mesenquimal de ambas poblaciones se confirmó mediante CD73 y CD90 (Figura 40-B), que parecían expresarse más en la población positiva. Sin embargo los marcadores hematopoyéticos se expresaban tenuemente y de una manera similar en ambas poblaciones.

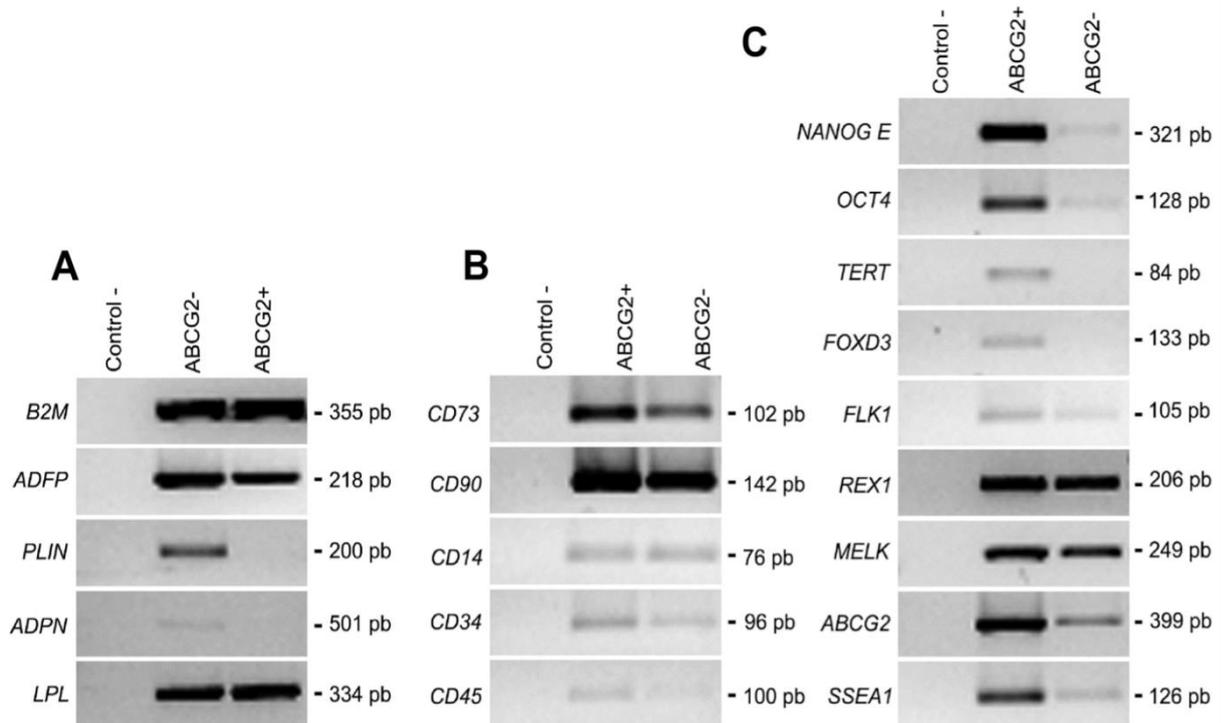


Figura 40: Estudio molecular de la expresión de diferentes genes en las poblaciones ABCG2⁺ y ABCG2⁻ aisladas. A) Análisis de la expresión de genes característicos de adipocitos maduros. Se observa la disminución de B) Expresión de genes mesenquimales y hematopoyéticos. C) Análisis de la expresión de genes de indiferenciación temprana. En la Figura se incluyen el gen de expresión constitutiva B2M y el control negativo.

El grado de indiferenciación de las células ABCG2 aisladas se estudió mediante la expresión de marcadores de indiferenciación tempranos y de células madre embrionarias. Como puede observarse en la Figura 40-C, las células contenidas en la fracción ABCG2⁺ expresaban niveles más altos de NANOG, OCT3/4, TERT, FOXD3, FLK1 y SSEA1 que las negativas, y similares para REX-1 y MELK.

El aislamiento de las células ABCG2⁺ permite definir una subpoblación dentro de la población heterogénea del tejido adiposo con un potencial indiferenciado elevado. Sin embargo debido a inconvenientes derivados del método, concretamente debido a la poca densidad celular ABCG2⁺ obtenida, el estudio de la diferenciación dirigida no fue posible.

V.2.B. Aislamiento de células SSEA1⁺

Otro de los marcadores candidatos era SSEA1, que también apareció expresado en el análisis de microarrays. Las funciones de este marcador, se han expuesto en la introducción de esta tesis doctoral. Para proceder al aislamiento celular, las muestras de hASC se levantaron del cultivo en los primeros pases (hasta pase 2) y se incubaron con el anticuerpo SSEA1 y con el correspondiente isotipo. En primer lugar, se delimitó la población hASC en base a su morfología, complejidad y tamaño (R1) (Figura. 41-A). A continuación se procedió a acotar las regiones positiva (R4) y negativa (R5) (Figura. 41-B). La muestra tratada con el anticuerpo contra la proteína SSEA1 se pasaba por el aparato, separando la fracción positiva de la negativa y descartando el ruido de fondo controlado mediante el isotipo (Figura. 41-C). La Figura 41-D muestra el porcentaje de células SSEA1⁺ obtenido.

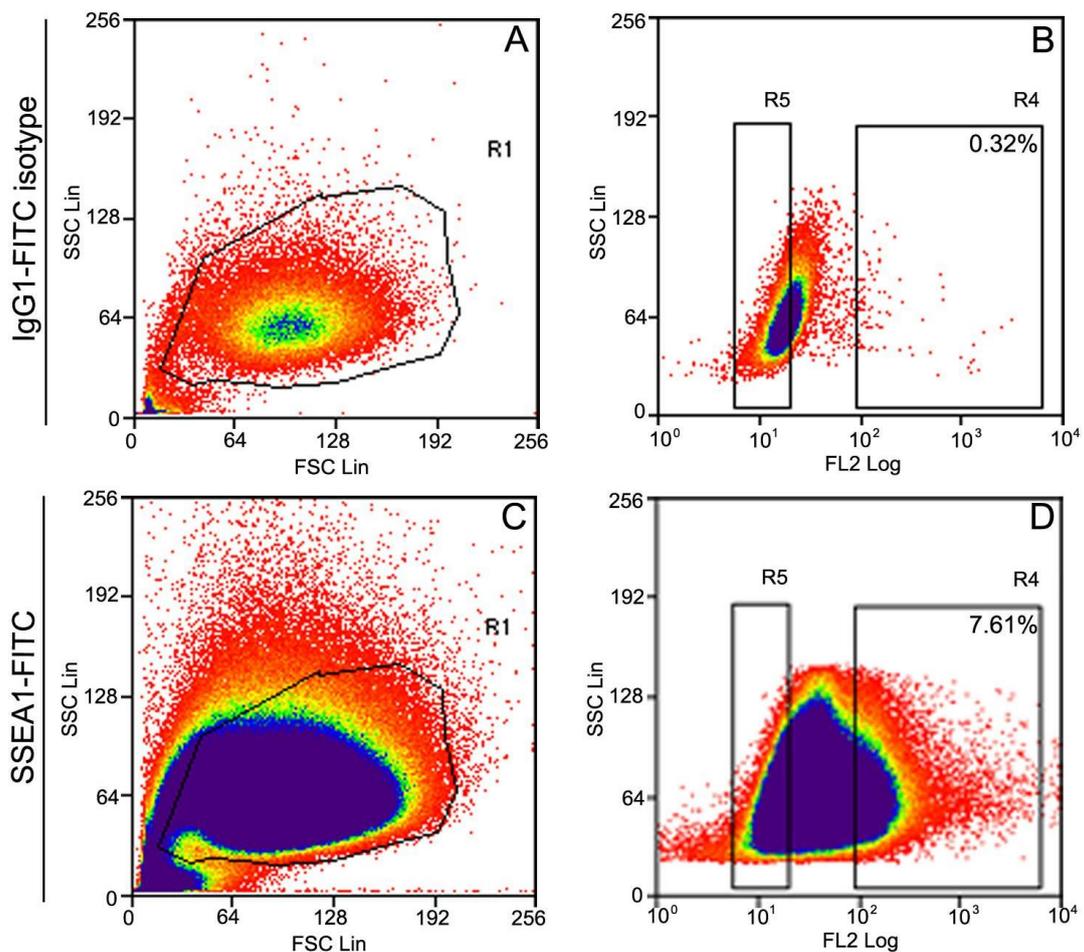


Figura 41. Aislamiento mediante Cell- Sorting de la población SSEA1. El análisis previo de la morfología celular (A) y el isotipo (B) permitió la separación de la población a analizar (C) en las dos poblaciones, positiva (R4) y negativa (R5) para al SSEA1 (D).

El aislamiento de las células positivas se repitió una n=10. La cantidad de células positivas para el SSEA1 era variable de unas muestras a otras (Figura 42).

V.2.B.i. Variabilidad de las muestras aisladas con SSEA1

Como puede observarse en la Figura 42, el porcentaje de células SSEA1⁺ era muy variable entre donantes. Encontramos cultivos que poseían un porcentaje bajo, como era el caso de L#71, siendo de 2.58% o bien L#63, con un porcentaje de 3.27. Sin embargo, otros mostraban un porcentaje de células mucho más elevada que las anteriores, siendo de un 16.38% en el caso del donante L#68 o del 25% en el L79. No sabemos a qué se deben estas diferencias. La franja de edad de los donantes es la misma (18-35 años). La diferencia tampoco parece depender del sexo, ya que tenemos nuestras tanto de mujeres como de hombres y en ambos casos observamos la misma variabilidad.

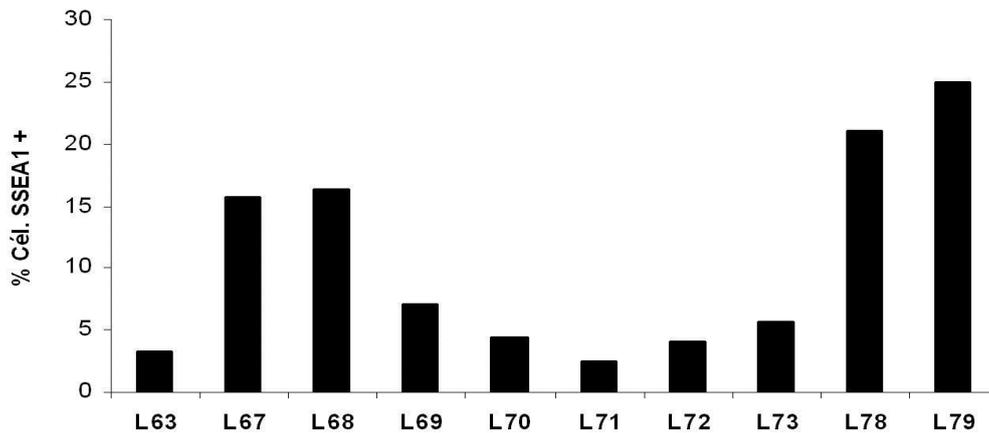


Figura 42: Porcentajes de la población enriquecida en SSEA1⁺ en los diferentes cultivos estudiados.

V.2.B.ii. Verificación del enriquecimiento de la población SSEA1⁺

La validación del aislamiento de las poblaciones SSEA1⁺ y SSEA1⁻ se realizó mediante RT-PCR y se muestra en la Figura 43.

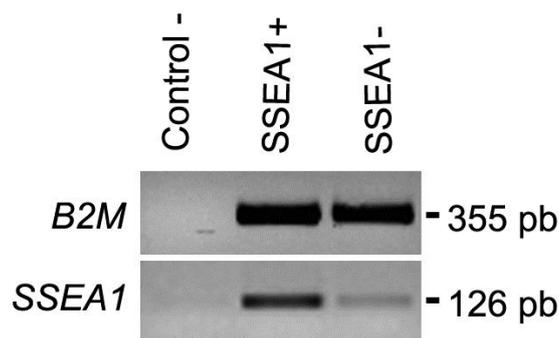


Figura 43: Expresión de SSEA1 en las poblaciones aisladas. Análisis de la expresión de SSEA1 en la fracción positiva y en la fracción negativa de la muestra aisladas mediante Cell- Sorting.

La verificación del Cell- Sorting también tuvo lugar mediante inmunocitoquímica contra el SSEA1, tanto de la fracción positiva como de la fracción negativa.

En la inmunocitoquímica observamos que la fracción positiva contenía casi la totalidad de las células marcadas contra el anticuerpo (Figura. 44-A). El marcaje de SSEA1 era un típico

marcaje punteado localizado en la membrana. Cuando se analizaron las inmunocitoquímica a mayor detalle, se observaba como la marca de la tinción se localizaba alrededor del núcleo, similar a una marca de retículo endoplásmico (Figura. 44-C). Esta marca intracelular, podía explicarse ya que a la hora de realizar la inmunocitoquímica, las muestras eran permeabilizadas, lo que permitía detectar la marca del SSEA1 que se estaba sintetizando en el REr. La figura 44-B muestra las células procedentes de la población SSEA1⁻, donde no se observa marcaje, a excepción de una célula, lo cual puede explicar que el enriquecimiento de la población SSEA1⁻ no sea perfecta y por ello exista expresión (Figura 43).

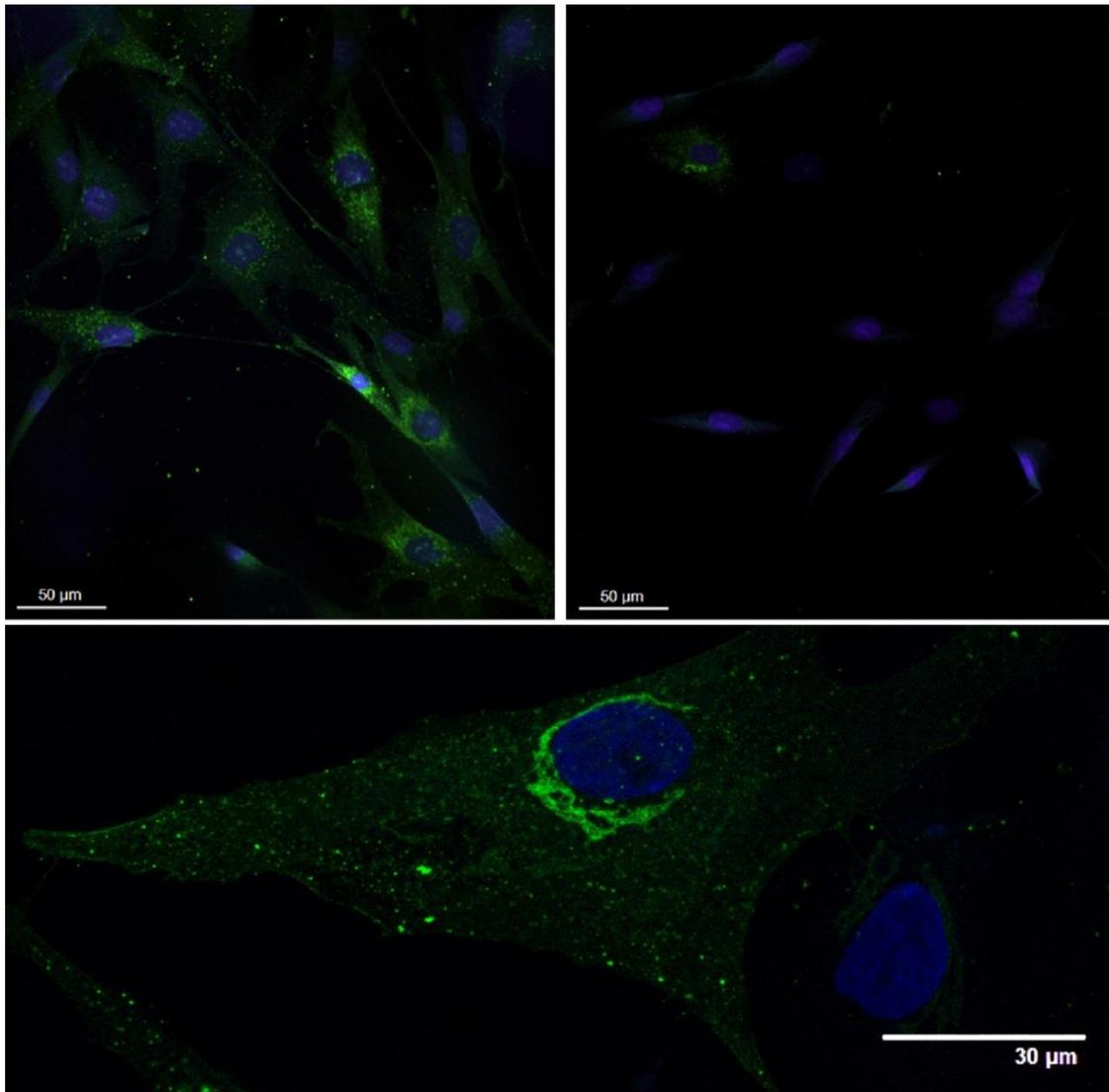


Figura 44: Verificación del aislamiento mediante inmunocitoquímica de las poblaciones aisladas frente a SSEA1. A) Fracción positiva aislada frente a SSEA1. B) Fracción negativa aislada frente a SSEA1. C) Localización perinuclear del marcaje de SSEA1 en la fracción positiva.

V.2.B.iii. Caracterización morfológica de las poblaciones SSEA1⁺ y SSEA1⁻

Las células SSEA1⁺ y SSEA1⁻ separadas se sembraron en placas de cultivo y fueron mantenidas durante 24-48 horas para el estudio de la morfología celular. Durante el tiempo que permanecieron en cultivo, las células tanto las SSEA1⁺ (Fig. 45-A) como las SSEA1⁻ (Fig. 45-B), presentaban una morfología celular fusiforme.

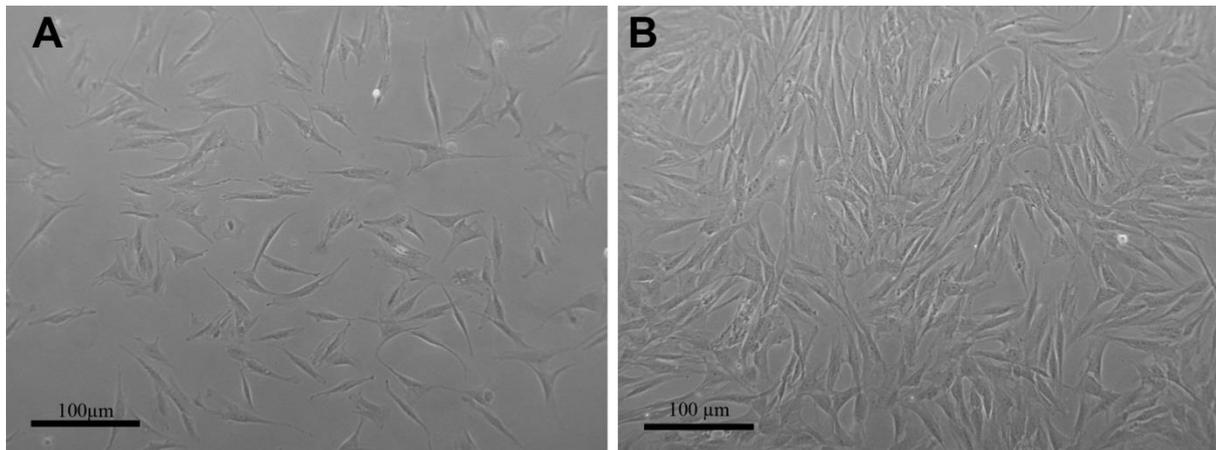


Figura 45: Cultivos de las células aisladas contra el marcador SSEA1. A) Imagen en campo claro de células SSEA1⁺ en cultivo. B) Imagen en campo claro de células SSEA1⁻ en cultivo.

En el estudio morfológico en cortes semifino de las células SSEA1⁺ se observó la morfología fusiforme y unos núcleos ovalados que podían presentar más de dos nucleolos muy densos. El contenido citoplasmático se caracterizaba por estar muy vacuolizado y contener una densidad de orgánulos elevada (Figura 46-A). Al ME, el núcleo presentaba una cromatina laxa, sin formación de acúmulos ni grumos en el interior de la membrana nuclear (Figura 46-B). El contenido citoplasmático mostraba un RER desarrollado sin presentar dilataciones (flechas negras) y unas mitocondrias alargadas (flechas blancas) (Figura 46-B). También se caracterizaban por presentar gran cantidad de gotas lipídicas (asterisco negro) y algunos cuerpos densos (asterisco blanco) (Figura 46-C). Por otra parte también se estudió la morfología y contenido citoplásmico de las SSEA1⁻ y se observó que la población negativa no difería en cuanto morfología con la positiva, mostrando al igual que la población SSEA1⁺, (Figura 46-D), un cuerpo celular alargado, un núcleo también ovalado aunque los nucleolos que se observaban en la población negativa no estaban tan condensados como las células positivas. También observamos al ME las preparaciones, las cuales presentaban una cromatina laxa. El contenido citoplásmico que se pudo observar era muy similar a la población positiva aunque la densidad en orgánulos parecía ser mucho mayor, existiendo cisternas de RER en algunos casos dilatadas (flecha negra), aparatos de Golgi muy desarrollados, presencia de múltiples gotas lipídicas (asterisco negro), gran cantidad de cuerpos densos (asterisco blanco) y mitocondrias muy alargadas e irregulares (flechas blancas) (Figura 46-E y F).

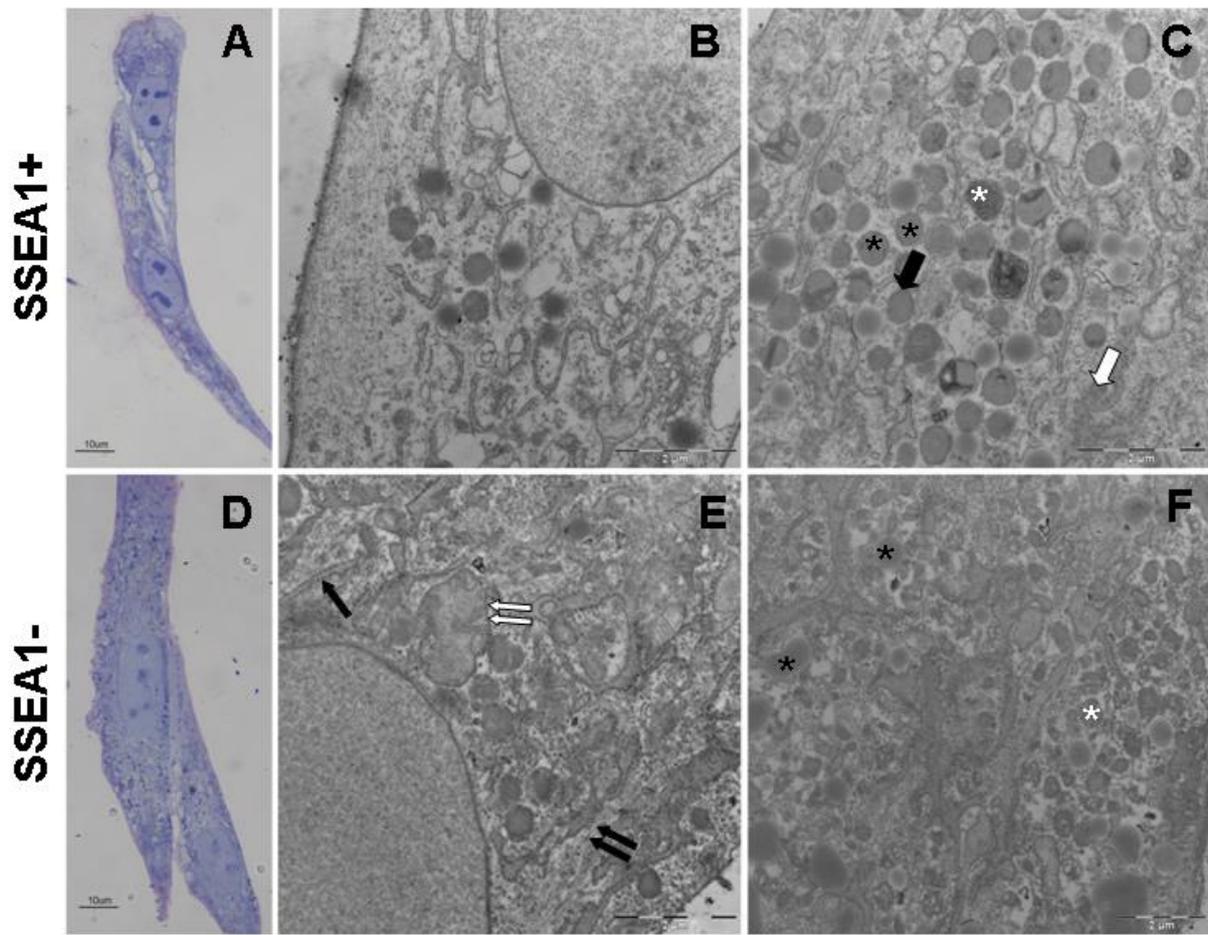


Figura 46: Caracterización morfológica de la población SSEA1 positiva y negativa aislada mediante Cell-Sorting. A) Sección semifino de células SSEA1+. B) Secciones de ultrafino células SSEA1+. Detalle del RER no dilatado (flechas negras) y mitocondrias alargadas (flechas blancas). C). Detalle de las gotas lipídicas (asterisco negro) y cuerpos densos (asterisco blanco). D) Sección semifino de células SSEA1⁻. E) Secciones de ultrafino células SSEA1⁻. Detalle de mitocondrias irregulares (flechas blancas) y los RER desarrollados y dilatados (flecha negra). F) Detalle de las gotas lipídicas (asterisco negro) y los cuerpos densos (asterisco blanco).

V.2.B.iv. Caracterización molecular de las poblaciones SSEA1⁺ aisladas

Tras el aislamiento, parte de la muestra se preserva para la posterior extracción de ARN y análisis de PCR. Se analizó la expresión de marcadores de células madre mesenquimales, tejido adiposo, marcadores hematopoyéticos y genes tempranos de indiferenciación. Cuando analizamos los marcadores de tejido adiposo observamos que ADFP y LPL se expresaban en ambas poblaciones aisladas (Figura 47-A), aunque LPL parecía tener niveles menores en las células SSEA1⁻. Perilipina (PLIN) se detectaba en la fracción positiva.

Tanto las células SSEA1⁺ como las negativas expresaban CD73 y CD90, (Figura 47-B). En el caso de los marcadores hematopoyéticos, la fracción positiva expresaba débilmente CD14 y CD34 pero no CD45.

Por último se analizó una batería completa de marcadores de indiferenciación temprana. En la Figura 47-C se observa como la fracción SSEA1⁺ expresa Nanog, OCT-3/4, Flk1, FOXD3, REX-1, MELK y ABCG2, mientras que la fracción SSEA1⁻ solo expresaba FLK1, REX-1, Melk y niveles bajos de ABCG2. Esto indicaba que a pesar de que las células SSEA1⁺ expresaban determinados marcadores ubicuos de células con potencial de diferenciarse a grasa madura, parecían estar en un estadio más temprano de diferenciación.

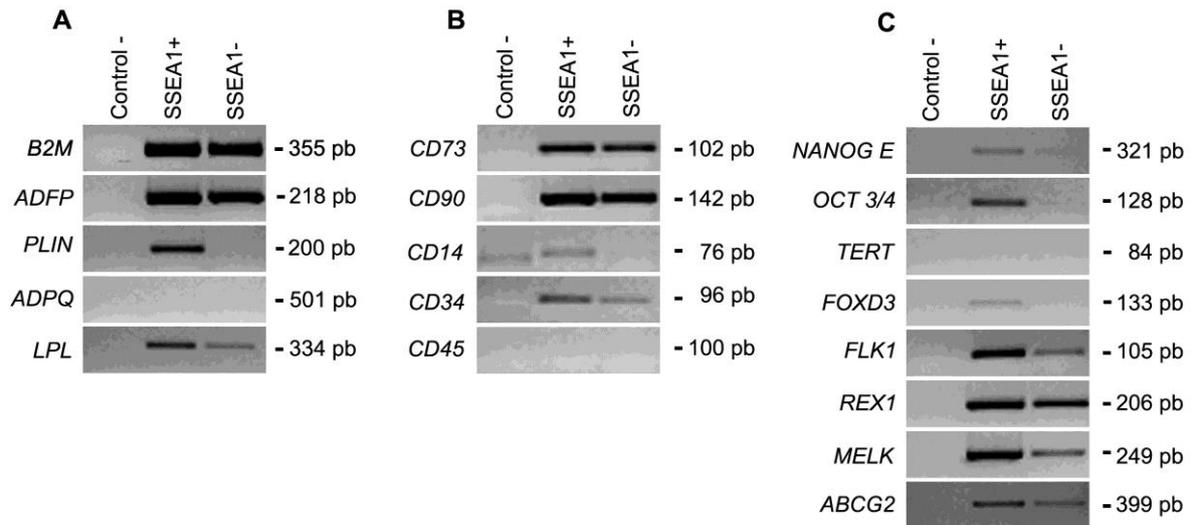


Figura 47: Caracterización molecular de las hASC aisladas frente al marcador SSEA1. A) Expresión de marcadores de tejido adiposo, los cuales se expresan tanto en la población positiva como negativa, a excepción de PLIN. B) Expresión de marcadores de linaje mesenquimal y hematopoyético. Se observa que la expresión de los marcadores mesenquimales es similar en ambas poblaciones, en cambio el marcador hematopoyético CD14 se expresa en la población positiva. C) Expresión de marcadores de indiferenciación. En algunos casos, se observa únicamente o en mayor grado en la población positiva.

Dada la relevancia de estos resultados, se procedió a realizar una cuantificación empleando Q-PCR. Durante estos experimentos se incluyeron además de aquellos genes que mostraron diferencias en la RT-PCR, otros que podían resultar de interés como CXCR4 y c-Kit/CD117. (Figura 48)

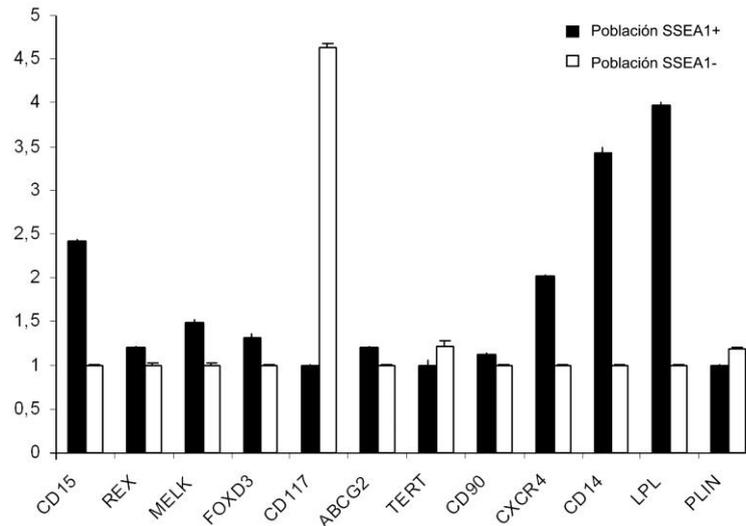


Figura 48: Caracterización molecular de las hASC aisladas frente al marcador SSEA1 mediante Q-PCR.

El análisis mediante Q-PCR, permitió confirmar que las células SSEA1⁺ presentaban un estadio más temprano de diferenciación y dada la expresión de marcadores como CXCR4 o CD14, podrían presentar mayor facilidad para diferenciarse a precursores de mesodermo.

V.2.B.v. Diferenciación de la población SSEA1⁺

La diferenciación de la población SSEA1⁺ y la población SSEA1⁻ se llevó a cabo utilizando los protocolos descritos en el apartado de material y método de la presente tesis.

V.2.B.v.1. Las hASC SSEA1⁺ se diferencian a células que expresan marcadores neurales

Tras mantener las células en cultivo con tres tipos de medio. Medio de diferenciación con factores de crecimiento, medio basal para cultivo de células neurales y medio control para células mesenquimales con HS. Tras 21 días en cultivo, se procedió al análisis de marcadores de diferenciación neural mediante RT-PCR.

Para el análisis de neuroectodermo se emplearon dos genes característicos, GFAP, proteína propia de astrocitos maduros y MAP2 utilizado como marcador de neuronas.

Cuando observamos los resultados obtenidos en la RT-PCR para las células SSEA1⁺, observamos que. GFAP parecía expresarse muy débilmente tanto en el medio control para hASC como en los cultivos tratados con medio de diferenciación y factores de crecimiento. En el caso de las células SSEA1⁻, solo parecían expresar GFAP débilmente cuando se las mantenía en cultivo con medio de diferenciación con factores (Figura 49A). En el caso del marcador neuronal, tanto las células SSEA1⁺ como las SSEA1⁻, expresan niveles bajos de MAP2 cuando se mantienen en cultivo con medio basal (MB) y medio de diferenciación (MD) durante 21 días (Figura 49-A).

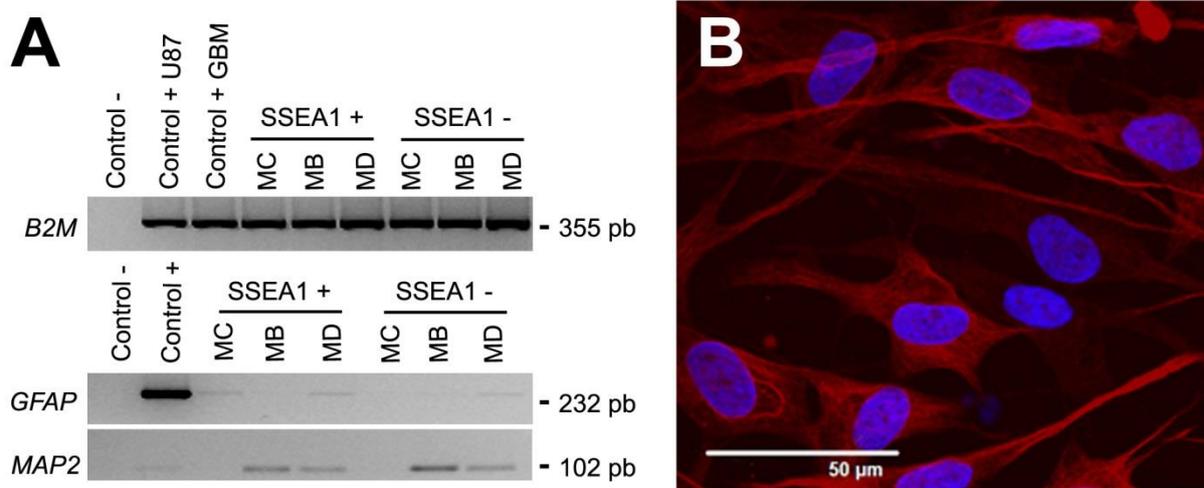


Figura. 49: Caracterización de la diferenciación hacia neuroectodermo. A) Expresión de marcadores moleculares propios de tejido neuronal: GFAP y MAP2 para las poblaciones SSEA1 positivas y negativas, en diferentes condiciones de cultivo, en medio mesenquimal o medio control (MC), en medio basal (MB) y en medio de diferenciación (MD). Se incluyen controles positivos del marcador, línea de celular de glioblastoma (GBM) U87 y tejido de GBM. En la Figura también se representa la B2M, control de carga (gen de expresión constitutiva) y el control negativo (Control -) de expresión. Se observa que tanto las células positivas como negativas expresan marcadores neurales cuando son cultivadas en MB y MD pero no cuando éstas son cultivadas en MC .B) Inmunocitoquímica positiva contra GFAP en células SSEA1⁺ mantenidas en medio de diferenciación con factores durante 21 días. Se observa el típico patrón de citoesqueleto neural.

En la inmunocitoquímica contra el marcador MAP2, (Figura 49-B) se muestran que las células SSEA1⁺ aparecen marcadas contra este marcador específico del citoesqueleto neuronal, por lo que la diferenciación a neuro fue exitosa.

Los resultados obtenidos demostraron que ambas poblaciones parecían tener cierta capacidad de dar lugar a precursores neurales pero a niveles bajos.

V.2.B.v.2. *Las hASC SSEA⁺ se diferencian a precursores endodérmicos*

El ARNm de las células SSEA1 tanto positivas como negativas que fueron cultivadas en medio de diferenciación hacia tejido hepático durante 21 días. Transcurrido este periodo, se analizaron las muestras obtenidas mediante RT-PCR contra diferentes marcadores de tejido hepático y pancreático. También se incluyeron células cultivadas en medio control (MC).

Para estudiar la diferenciación hacia linaje endodérmico, se analizaron la expresión de ARNm de genes específicos de hepatocitos, como son α -fetoprotina (AFP), transtirretina (TTR), el factor nuclear de hepatocito 1 α (HNF1 α) y el factor nuclear de hepatocito 3 β (HNF3 β). También se estudiaron CXCR4 (marcador de endodermo definitivo) y precursores de páncreas (PAX6). Como se pudo observar en la Figura 50, tanto la población negativa como la positiva expresaba el marcador de la AFP, mientras que en las poblaciones

cultivadas en medio control, no aparecía este marcador. Lo mismo ocurrió para HNF1 α y HNF3 β , que se expresaban en ambas poblaciones tras su exposición al medio inductor de la diferenciación, aunque en niveles muy bajos. En el caso de TTR, marcador de maduración hacia hepatocito, únicamente pudimos observar expresión en nuestras células SSEA1⁺ que fueron cultivadas en el medio de diferenciación (Figura 50). Cuando analizamos los marcadores moleculares pancreáticos vimos que la expresión de NGN3 era muy débil y sólo se daba en células SSEA1⁺ cultivadas con medio de diferenciación. En el caso de PAX6, se observó expresión en las células SSEA1⁺ tratadas con los medios inductores de diferenciación y también en las SSEA⁻ (Figura 50).

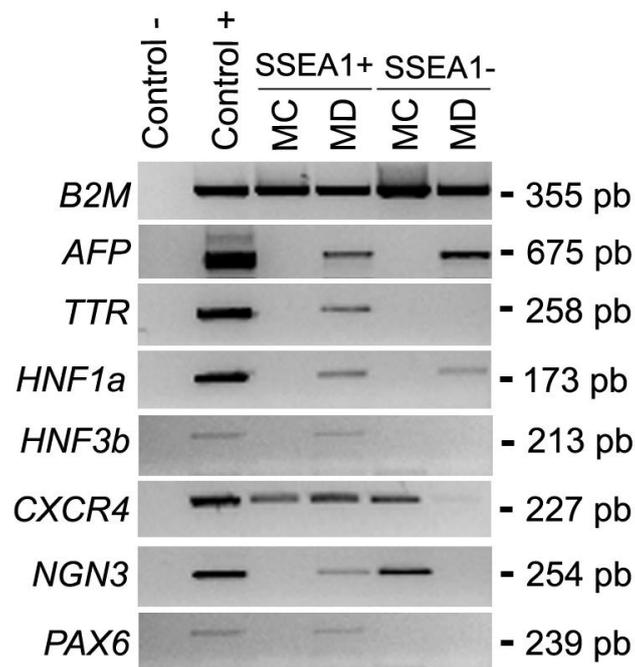


Figura. 51: Análisis por RT-PCR de la expresión de genes específicos de hígado para determinar la diferenciación hacia linaje endodérmico. La expresión de AFP, CXCR4, HNF1 α , HNF3 β , PAX6 y TTR se muestran para las dos poblaciones diferenciadas, la población positiva para SSEA1 y la población negativa, mantenidas en dos condiciones diferentes, en medio control (MC) y en medio de diferenciación (MD). También se incluyen el control negativo el control positivo que corresponde a una muestra de tejido hepático comercial, así como el gen de expresión constitutiva B2M.

La diferenciación a precursores de linaje hepático (como ejemplo del linaje endodérmico) se dio tanto en células SSEA1⁺ como SSEA1⁻, aunque esta última más levemente que la primera.

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

Las células madre mesenquimales (MSC's) han estado empleándose en clínica con éxito desde hace más de 30 años y son hasta el momento, el tipo celular más usado en aplicaciones pre-clínicas o quirúrgicas (Planat-Benard, Silvestre et al. 2004, Alvarez, Garcia-Arranz et al. 2008).

Estas células pueden aislarse a partir de diversos tejidos, incluyendo la fracción estromal de la médula ósea y el tejido adiposo (Kern, Eichler et al. 2006).

A pesar de que comparten la mayoría de sus características, como ya se ha mencionado con anterioridad, las células madre del tejido adiposo presentan algunas ventajas con respecto a sus homólogas de la médula ósea, lo que las convierte en poderosos candidatos para su uso en medicina regenerativa a corto y medio plazo. En primer lugar, las hASC pueden aislarse a partir de una de las fuentes más abundantes en el cuerpo humano, la grasa. Por cada gramo de tejido, pueden obtenerse unas 500 veces más MSC's que por gramo de médula ósea (Fraser, Zhu et al. 2008, Kuhbier, Weyand et al. 2010). Además son sencillas de extraer, mantener y expandir en el laboratorio (Escobedo-Lucea, Bellver et al. 2013) y son capaces de secretar citoquinas que pueden actuar como agentes inmunomoduladores o activar rutas angiogénicas (Puissant, Barreau et al. 2005, Gimble, Katz et al. 2007).

Las células madre mesenquimales del tejido adiposo han demostrado tener un enorme potencial para su uso en clínica (Garcia-Olmo, Garcia-Arranz et al. 2005, Georgiev-Hristov, Garcia-Arranz et al. 2013) pero uno de los principales problemas del campo es el uso de reactivos de origen animal en los protocolos de extracción y empleo de las hASC debido al riesgo de zoonosis.

El primer objetivo de esta tesis doctoral, era el diseño de un protocolo que nos permitiese aislar y mantener células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo humano sin emplear reactivos de origen animal.

A pesar de que el riesgo de transmisión de priones desde el FBS puede evitarse empleando suero producido en Nueva Zelanda, se ha demostrado que el empleo de 10% de FBS en el medio de cultivo para mantener MSCs, produce que estas células humanas incorporen de 4.5 a 15 mg de proteínas de origen bovino (Sundin, Ringden et al. 2007).

Lo que es capaz por sí solo de inducir una respuesta inmune en pacientes tratados con estas células mesenquimales (Horwitz, Prockop et al. 1999). (Shahdadfar, Fronsdal et al. 2005)

Además, diversos autores han reportado la existencia de diferencias en la expresión génica de las MSC dependiendo de si su cultivo ha sido llevado a cabo con FBS o con HS (Shahdadfar, Fronsdal et al. 2005, Lindroos, Aho et al. 2010).

Esta evidencia confirma las sospechas de que el uso de FBS puede afectar al comportamiento celular, los procesos de diferenciación y senescencia, y que incluso puede ser capaz de contribuir a aumentar la inestabilidad genética. Otros grupos han intentado

resolver el problema de la zoonosis en las MSCs introduciendo diversas modificaciones en los protocolos de aislamiento y cultivo como el uso de suero humano autólogo (Stute, Holtz et al. 2004), medio de cultivo sin suero (Muller, Kordowich et al. 2006) o factores plaquetares (Bieback, Hecker et al. 2009)

Spees y colaboradores también han desarrollado un procedimiento para eliminar la contaminación por FBS, aunque cabe destacar que dada la eficiencia de los sustitutos humanos, este protocolo no parece muy necesario en el futuro (Spees, Gregory et al. 2004).

A pesar de estas mejoras, el FBS no es el único reactivo de origen animal empleado en protocolos de aislamiento y expansión de MSCs. El uso de productos como albúmina bovina (BSA) o tripsina (cuyo origen es el páncreas de cerdo) es habitual en este tipo de procedimientos en la mayoría de los laboratorios. En este sentido, nuestros esfuerzos también estaban dirigidos a eliminar estos componentes en el protocolo de aislamiento y diferenciación de las hASCs, sustituyéndolos por albúmina de suero humano (HSA) y Tryple® un reactivo capaz de cortar las uniones intercelulares. Actualmente el uso de Tryple® está muy extendido y ha sido aceptado por la comunidad científica como un perfecto sustituto de la tripsina. En nuestro caso, tras su empleo rutinario durante más de 20 pases, nunca hemos detectado la aparición de anomalías en el cariotipo.

Como se demuestra en el apartado de resultados, las mejoras introducidas durante la creación del nuevo protocolo desarrollado durante esta tesis doctoral, no comprometen la viabilidad, el crecimiento o las características de las líneas de células madre obtenidas. En su lugar, como se ha demostrado en el apartado de resultados, incluso mejoran algunas de ellas. Es el caso del uso de HS, que permitió aumentar la proliferación hasta pase 18 (33.9 ± 4.1 frente al 13.9 ± 3.3 en el caso de los cultivos mantenidos con FBS).

El uso de suero humano no parece inducir cambios a nivel de morfología celular o ultraestructural de las hASC, que continúan manteniendo un aspecto fibroblástica semejante al descrito por otros autores (Zuk, Zhu et al. 2001, Kuhbier, Weyand et al. 2010).

La introducción además de varios ciclos de lavado y centrifugación con HSA durante el proceso de aislamiento, también ha resultado ser beneficioso, ya que ha permitido eliminar la práctica totalidad de los adipocitos maduros contenidos en la muestra de partida.

Durante el proceso de mantenimiento y expansión no se observa ningún aumento en el número de adipocitos maduros debido a fenómenos de diferenciación incontrolada. Esto indica que tanto las condiciones como el medio de cultivo diseñados, son capaces de contribuir al mantenimiento de la capacidad multipotente de las hASC. Con respecto al patrón indiferenciado de expresión génica, los niveles de marcadores mesenquimales se mantenían altos incluso tras 5 pases. Este resultado valida y confirma que nuestras condiciones son las adecuadas para preservar el estado indiferenciado de las hASC. Por otra parte, la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD14 o CD45, que fueron detectados tras el aislamiento en algunos de los donantes, decrecía progresivamente con la evolución de los cultivos, tal y como se pudo confirmar con los estudios realizados mediante análisis de microarrays. Al mismo tiempo, durante el proceso de aislamiento y los pases iniciales, se pudo detectar la expresión de marcadores de progenitores de tejido adiposo, confirmando el origen de la gran mayoría de las células presentes en los cultivos.

Con respecto a los estudios de diferenciación nuestros resultados confirman que las hASCs obtenidas mediante nuestro protocolo mantienen su capacidad multipotente. Los análisis de expresión génica y ultraestructurales de las células diferenciadas revelaron la obtención de cartílago, adipocitos maduros y precursores de osteocitos.

Para poder confirmar que las condiciones de cultivo diseñadas no alteraban las propiedades de las hASC o inducían ningún tipo de transformación celular, se llevó a cabo el análisis de microarrays. Como se describe en resultados, lo que observamos tras la realización de estos análisis fue que en el caso de los genes up-regulados, el comportamiento seguido por las hASC durante la evolución del cultivo seguía los pasos clásicos de adaptación al cultivo *in vitro*. Estas observaciones se corresponden con lo descrito durante los estudios de la curva de proliferación, es decir que las células mantenidas con HS se encuentran en plena fase de crecimiento exponencial alrededor de pase 5. En resumen, los patrones de expresión indican que durante la fase inicial tras el aislamiento, las hASCs se adhieren al sustrato de cultivo para continuar adaptándose progresivamente a las condiciones de cultivo *in vitro*, para finalmente, comenzar la activación de distintas rutas de proliferación celular. Durante la realización de estos estudios no se detectó la activación de rutas de senescencia o relacionadas con muerte celular.

Los genes que disminuían su expresión entre los distintos pases también fueron estudiados, observándose que inmediatamente después del aislamiento, bajaban los niveles de expresión de mediadores relacionados con rutas de migración y proliferación. Este resultado estaba en consonancia con lo observado para los genes up-regulados, que en ese momento expresaban una gran cantidad de mediadores de adhesión. Al comparar pase 3 contra 1 y el 5 contra el 3, se encontró una reducción en la expresión de genes relacionados con rechazo inmunológico. Esto puede explicarse por la progresiva desaparición de precursores sanguíneos en la muestra tras los sucesivos lavados y cambios de medio y sobre todo, debido al hecho de que las hASC son un tipo celular inmunomoduladora (Yanez, Lamana et al. 2006, Fang, Song et al. 2009, Yanez, Oviedo et al. 2010).

Por lo tanto el análisis de microarray nos permitió concluir que nuestro protocolo no afecta la viabilidad, propiedades y potencial de las hASC.

Otro hecho a destacar es que la eliminación del paso de lisis de eritrocitos, ha facilitado también mantener una mayor heterogeneidad en la muestra obtenida.

A nivel morfológico, se comprobó que las células obtenidas empleando el nuevo procedimiento, mantenían el aspecto y las características morfológicas típicas de hASC.

Los resultados obtenidos en el apartado de caracterización molecular, permiten concluir que, mediante los ciclos de lavado y centrifugación introducidos en el protocolo de aislamiento, conseguimos eliminar la mayor parte de los adipocitos maduros, sin que aparentemente esto afecte a las células madre mesenquimales presentes en la suspensión celular conseguida. Además, durante el proceso de mantenimiento y expansión de los cultivos celulares, no hay un incremento de la presencia de adipocitos maduros debida a un proceso de diferenciación incontrolada, lo que indica que tanto los medios, como las condiciones en las que se mantienen los cultivos contribuyen a preservar su capacidad multipotente. Dichos marcadores continúan manteniendo niveles de expresión detectable tras expandir los cultivos al menos 5 veces, lo que indica que las condiciones de

mantenimiento del mismo parecen ser las adecuadas para preservar la capacidad multipotente característica de las hASC. Así mismo, podemos observar que la expresión de marcadores característicos de células madre hematopoyéticas como CD45 o que se detectan en las fases iniciales de aislamiento y cultivo, van desapareciendo progresivamente hasta dejar de expresarse. Esto indica que todas las células madre presentes en el cultivo después del primer pase, tienen un origen claramente adiposo y no derivan de las células sanguíneas que pudieran haber quedado al evitar el paso con el tampón de lisis. La sustitución de este paso del procedimiento, por una serie de lavados sistemáticos, no sólo es posible y viable, si no que evita la exposición de la suspensión celular obtenida, a un choque osmótico que, sin duda, tendría algún tipo de repercusión en ellas.

Los resultados muestran que las células hASC obtenidas mediante nuestro protocolo de aislamiento mantienen su capacidad de diferenciación multipotente, dando lugar a células endoteliales, adipocitos, cartílago y hueso.

Durante los últimos años, distintos grupos de investigación han evidenciado la heterogeneidad de la fracción vascular estromal, como también se denomina a la población hASC capaz de adherirse al plástico (Madonna, Geng et al. 2009). En el momento de realización de esta tesis doctoral, se conocía la heterogeneidad de las hASC pero todavía no se había logrado caracterizar la naturaleza de sus distintas poblaciones ni su grado de diferenciación, por lo que nuestro grupo se decidió a llevar a cabo el aislamiento de algunas de los distintos precursores presentes en la fracción hASC.

Para ello, y empleando los resultados obtenidos durante los análisis de microarray, se procedió a intentar el aislamiento de dos subpoblaciones que aparecían representadas en dichos análisis: los precursores ABCG2⁺ y una población SSEA-1⁺.

La presencia de una “side population” ABCG2⁺, es uno de los puntos más controvertidos en la literatura sobre hASC. Mientras algunos autores no encontraron células ABCG2⁺ o con marcadores adicionales de stemness (Katz, Tholpady et al. 2005)

Estudios posteriores han reportado la expresión del transportador en el momento del aislamiento de la población (Marappagounder, Somasundaram et al. 2012). Durante los experimentos llevados a cabo se pudo observar que a práctica totalidad de las muestras aisladas, contenían células ABCG2⁺, aunque los niveles de expresión eran unas 20 veces más altos tras el aislamiento células y la expresión de este marcador disminuía drásticamente a medida que avanzaba el cultivo. Como pudo comprobarse mediante los ensayos realizados por PCR, las células ABCG2⁺ expresaban también otros marcadores de stemness como Nanog E, Oct3/4, Tert, FoxD3, Flk-1, Rex-1 o Melk. También expresaban niveles más altos de SSEA1.

A pesar de que se intentó cultivar estas células para poder analizar su capacidad de diferenciación, el bajo número de células obtenidas tras cada aislamiento no permitió llevar a cabo estos experimentos con éxito.

SSEA1 es uno de los marcadores de células madre pluripotentes en ratón. Recientemente, su expresión también se ha reportado en precursores mesenquimales en tempranos , donde

parece que está relacionado con diferenciación a endotelio y otros precursores vasculares (Finan, Sopko et al. 2013).

Durante el proceso de aislamiento de células ABCG2⁺, descubrimos la presencia de células positivas para SSEA1, por lo que decidimos intentar aislar también estos potenciales precursores. Como se ha podido observar en los resultados presentados en esta tesis, su presencia variaba de unos donantes a otros. A pesar de que a nivel morfológico no se observaron diferencias entre las células SSEA1⁺ y la fracción negativa para este marcador, a nivel de expresión génica, el patrón de la fracción positiva parece corresponderse más con el de una población más temprana.

Con el objeto de comprobar si al igual que ocurre en ratón, las células SSEA1⁺ podían dar lugar a ectodermo, mesodermo y endodermo, decidimos realizar experimentos de diferenciación inducida hacia tejido neural, precursores pancreáticos y endotelio. Para ello se utilizaron protocolos ampliamente aceptados por la comunidad científica: ectodermo (Simon, Escobedo et al. 2005) y endodermo (D'Amour, Agulnick et al. 2005). Estos experimentos nos permitieron comprobar que las células SSEA1⁺ parecen ser capaces de dar lugar a células precursoras de endodermo y ectodermo tras su cultivo en las condiciones adecuadas. Los resultados demostraron que a pesar de que se apreciaban ligeras variaciones en la expresión de algunos marcadores de ectodermo y endodermo entre la fracción positiva y la negativa, no había evidencias suficientes de que las células SSEA1⁺ fuesen claramente pluripotentes, al menos en nuestras manos o con los protocolos empleados. Los resultados obtenidos tampoco arrojaron ninguna luz a cerca de la funcionalidad de las células obtenidas.

CONCLUSIÓN

VII. CONCLUSIÓN

- 1- Se ha conseguido por primera vez diseñar un procedimiento para aislar y mantener hASC sin utilizar ningún reactivo de origen animal.
- 2- La eliminación del tampón de lisis para evitar la presencia de los eritrocitos en el procedimiento de aislamiento de las hASC, permite mantener, preservar y proteger la capacidad indiferenciada de las células madre.
- 3- La sustitución del suero bovino fetal por el suero humano en el proceso de cultivo de las hASC, así como la sustitución de otros reactivos de origen animal (BSA, Tripsina...), no comprometen la viabilidad, el crecimiento o las características de las líneas de células madre obtenidas sino que incluso, permiten aumentar la proliferación celular.
- 4- El procedimiento, mantiene todas las características multipotentes propias de las hASC para diferenciarse a linaje mesodérmico, concretamente a endotelio.
- 5- El procedimiento, mantiene todas las características multipotentes propias de las hASC para diferenciarse a linaje mesodérmico, concretamente hacia adipocitos maduros.
- 6- El procedimiento, mantiene todas las características multipotentes propias de las hASC para diferenciarse a linaje mesodérmico, concretamente a cartílago.
- 7- El procedimiento, mantiene todas las características multipotentes propias de las hASC para diferenciarse a linaje mesodérmico, concretamente a hueso.
- 8- El análisis de microarray indica que en los primeros momentos después del aislamiento las células sobreexpresan genes de adherencia, como consecuencia de la adaptación a las condiciones del cultivo.

- 9- El cultivo de las hASC con nuestro procedimiento no conlleva el envejecimiento de nuestras células, al no activar rutas de senescencia ni muerte celular.
- 10- A partir de las muestras de hASC, se ha logrado identificar y aislar la subpoblación de células ABCG2⁺ que expresan marcadores de desarrollo tempranos.
- 11- A partir de las muestras de hASC, se ha logrado identificar y aislar la subpoblación de células SSEA1⁺ que expresan marcadores de desarrollo tempranos
- 12- En el caso de la subpoblación SSEA1⁺, se ha comprobado que tras ser sometidas a diferenciación dirigida, las células obtenidas son capaces de expresar marcadores característicos de ectodermo, mesodermo y endodermo, aunque no se ha conseguido demostrar su funcionalidad.

ANEXOS

VIII. ANEXOS

VIII.1. ANEXO 1. RECAPITULACIÓN DE LOS ENSAYOS REGISTRADOS EN LA PAG WEB “CLINICAL TRIAL” INVOLUCRANDO A LAS ASC

CAMPO DE APLICACIÓN	TÍTULO DEL ESTUDIO	ESTADÍO	FASE	INDENTIFICADOR	
1	Osteoartritis	Biological: Autologous adipose tissue stromal vascular fraction and platelet rich plasma	En proceso	Fase 1 y 2	NCT02142842
2	Osteoartritis	Adipose Cells for Degenerative Disc Disease	Reclutamiento		NCT02097862
3	Osteoartritis	Autologous Adipose Stromal Vascular Fraction Outcomes in Osteoarthritis Research Study	Reclutamiento		NCT02241408
4	Osteoartritis	Safety and Feasibility Study of Autologous Stromal Vascular Fraction (SVF) Cells for Treatment of Osteoarthritis	Reclutamiento		NCT01885832
5	Epicondelitis	Biological: ALLO-ASC(allogeneic adipose derived mesenchymal stem cell) injection	Reclutamiento	Fase 0	NCT01856140
6	Degeneración disco intervertebral	Safety and Efficacy of Autologous Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Patient With Lumbar Intervertebral Disc Degeneration	Reclutamiento		NCT01643681
7	Tennis Elbow	A Multi-center, Randomized, Placebo-controlled, Double-blind, Parallel-group, Phase I/II Clinical Study to Evaluate Safety and Efficacy of Allogeneic Adipose-derived Stem Cells for the Treatment of Lateral Epicondylitis	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT02131077
8	Articular Cartilage Defects	Randomized Controlled Trial of Microfracture Versus Adipose Derived Stem Cells for the Treatment of Isolated Articular Cartilage Defects	Reclutamiento		NCT02090140
9	Osteoartritis	Autologous Adipose- Adipose-erived Stromal Cells Delivered Intra-articularly in Patients With Osteoarthritis	Reclutamiento		NCT01739504
10	Articular Cartilage Defects	A Comparative Clinical Trial for the Repair of Chondral Knee Defects: Transplantation of Autologous Cultured Chondrocytes vs. Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01399749
11	Osteoartritis de rodilla	A Phase II b, Randomized, Double-blinded, Clinical Trial of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Progenitor Cells Therapy for Knee Osteoarthritis	En proceso	Fase 2	NCT02162693
12	Osteoartritis de rodilla	ADIPOA - Clinical Study	En proceso		NCT01585857
13	Osteoartritis de rodilla	Effectiveness and Safety of Intraarticular Administration of Autologous Adipose-Derived Regenerative Cells for Treatment of Degenerative Damage of Knee Articular Cartilage	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT02219113
14	Osteoartritis	Safety and Clinical Effectiveness of A3 SVF in Osteoarthritis	Reclutamiento		NCT01947348
15	Ortopédico	Enriched Autologous Fat Grafting for Treating Pain at Amputation Sites (AMP-5)	Reclutamiento		NCT01645722
16	Incontinencia fecal	Enriched Autologous Fat Grafting for Treating Pain at Amputation Sites (AMP-5)	Reclutamiento		NCT01645722
17	Enfermedad injerto #	Multicenter Clinical Trial for the Evaluation of Mesenchymal Stem Cells From Adipose	No consta		NCT01222039

	huésped	Tissue in Patients With Chronic Graft Versus Host Disease				
18	Ataxia cerebelar	Treatment of Cerebellar Ataxia With Mesenchymal Stem Cells	Completado	Fase 1 y 2	NCT01649687	
19	Colitis ulcerosa	A Phase I/IIa Clinical Trial to Evaluate Safety and Efficacy of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells (ASC) on Induction to Remission in Ulcerative Colitis	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01914887	
20	Autismo	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Delivered Intravenously in Patients With Autism	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01502488	
21	Didstrofia	Intramuscular Transplantation of Autologous Muscle Derived Stem Cell(MDSC) and Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells (AD-MSC) in Patients With Facioscapulohumeral Dystrophy (FSHD), Phase I Clinical Trial	Reclutamiento	Fase 1	NCT02208713	
22	Síndrome de la fragilidad	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Intra-venous Implantation of Autologous Adipose-Derived Stem Cells in Patients With Frailty Syndrome	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT02208713	
23	Esquizofrenia	Stem Cell-based Approaches to Neuronal Characteristics and Endophenotype of Schizophrenia in Genetic High Risk Subjects	Reclutamiento		NCT01943175	
24	Artritis reumatoide	Feasibility Study of Non-Expanded Autologous Adipose Tissue Derived Stromal Vascular Fraction Cells in Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARD) Resistant Rheumatoid Arthritis	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01885819	
25	Artritis reumatoide	"Phase Ib/IIa, Escalating Dose, Single Blind, Clinical Trial to Assess the Safety of the i.v Administration of Allogeneic Adipose-derived Mesenchymal Cells (eASCs) to Refractory Rheumatoid Arthritis (RA) Patients".	Completado	Fase 1 y 2	NCT01663116	
26	Daño ovárico	Effects of Adipose Derived Stem Cell Therapy in Women With Premature Ovarian Failure	Reclutamiento	Fase 4	NCT01853501	
27	Daño ovárico	Phase I/II Trial of Intraperitoneal Administration of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Infected With a NIS-Expressing Derivative Manufactured From a Genetically Engineered Strain of Measles Virus in Patients With Recurrent Ovarian Cancer	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT02068794	
28	Daño renal	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cell Delivered Into the Renal Artery and Intravenously in Patients With Renal Failure	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01453816	
29	Daño renal	Hypoxia and Inflammatory Injury in Human Renovascular Hypertension : Phase 1 Trial of Mesenchymal Stem Cell Therapy	Activo, no reclutameinto	Fase 1	NCT02266394	
30	Regeneración hepática	Liver Regeneration Therapy by Intrahepatic Arterial Administration of Autologous Adipose Tissue Derived Stromal Cells	Reclutamiento		NCT01062750	
31	Regeneració hepática	Liver Regeneration Therapy Using Autologous Adipose Tissue Derived Stromal Cells	Completado	Fase 1	NCT00913289	
32	Enfermedad de Parkinson	Outcomes Data of Adipose-Stem Cells to Treat Parkinson's Disease	Reclutamiento		NCT02184546	
33	Enfermedad de Parkinson	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Delivered Into the Vertebral Artery and	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01453803	

		Intravenously in Patients With Parkinson's Disease			
34	Infarto cerebral	Reparative Therapy in Acute Ischemic Stroke With Allogenic Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue. Safety Assessment. A Randomised, Double Blind Placebo Controlled Single Center Pilot Clinical Trial.(AMASCIS-01/2011)	Reclutamiento	Fase 2	NCT01678534
35	Infarto cerebral	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Delivered Into the Internal Carotid Artery and Intravenously in Patients After Stroke	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01453829
36	Daño cerebral	Treatment of Sequelae Caused by Severe Brain Injury With Autologous Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells	Completado	Fase 1 y 2	NCT01649700
37	Daño cerebral	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Delivered Via Catheter Into the Internal Carotid Artery and Intravenously in Patients With Diffuse Lesions in the Brain	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01453777
38	Enfermedad ocular	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Injected Intravitreal in Dry Macular Degeneration	Reclutamiento		NCT02024269
39	Enfermedad ocular	Phase IIa Clinical Trial to Study the Feasibility and Security of the Expanded Autologous Stem Cells (ASC) From Lipoaspirate in the Bilateral Limbic Associated Keratopathy Treatment	Reclutamiento	Fase 2	NCT01808378
40	Enfermedad ocular	Effectiveness and Safety of Subtenon Administration of Autologous Adipose-Derived Regenerative Cells for Treatment of Glaucomatous Neurodegeneration	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT02144103
41	Disfunción eréctil	H-34570: PHASE I Study: The Use of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell (AdMSC) for the Improvement of Erectile and Cardiac Function in Aging Men	Reclutamiento	Fase 2	NCT02107118
42	Disfunción eréctil	Autologous Adipose Derived Stromal Cells Delivered Into the Corpus Cavernosum in Patients With Erectile Dysfunction	Reclutamiento		NCT02087397
43	Disfunción eréctil	Phase 1 Study. Can Fat Derived Stem Cells (SVF) be Used in the Treatment of Erectile Dysfunction After Prostatectomy	Reclutamiento	Fase 1	NCT02240823
44	Esclerosis múltiple	Autologous Adipose Stromal Vascular Fraction Outcomes Research Study	Reclutamiento		NCT02157064
45	Esclerosis múltiple	Multicenter Clinical Trial Phase I / II Randomized, Placebo-controlled Study to Evaluate Safety and Feasibility of Therapy With Two Different Doses of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Patients With Secondary Progressive Multiple Sclerosis Who do Not Respond to Treatment	No consta	Fase 1 y 2	NCT01056471
46	Esclerosis múltiple	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Delivered Intrathecally and Intravenously Into Patients With Multiple Sclerosis	Activo, no reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01453764
47	Esclerosis múltiple	A Phase I/II, Open Label Study to Evaluate Safety, Tolerability and Therapeutic Effects of Transplantation of Autologous Cultured	Completo	Fase 1 y 2	NCT01051882

Mesenchymal Bone Marrow Stromal Cells Secreting Neurotrophic Factors (MSC-NTF), in ALS Patients.					
48	Diabetes	Phase I/II Study of Intravenous Administration of Activated Autologous Adipose Derived Stromal Vascular Fraction in Patients With Type 1 Diabetes	No consta	Fase 1 y 2	NCT00703599
49	Diabetes	Phase I/II Study of Intravenous Administration of Activated Autologous Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction in Patients With Type 2 Diabetes	No consta	Fase 1 y 2	NCT00703612
50	Diabetes	Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Delivered in Patients With Type II Diabetes	Reclutamiento		NCT01453751
51	Incintinencia urinaria	Phase II Clinical Trial to Study the Feasibility and Safety of the Expanded Autologous Stem Cells Use Derived From Adipose Tissue (e-ASC) for the Local Urinary Incontinence After a Radical Prostate Cancer Surgery	Completo	Fase 2	NCT01799694
52	Incintinencia urinaria	Phase II Clinical Trial to Study the Feasibility and Safety of the Expanded Autologous Mesenchymal Stem Cells Use Derived From Adipose Tissue (ASC) for the Local Feminine Stress Urinary Incontinence	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01804153
53	Incintinencia urinaria	Effectiveness and Safety of Cell-Assisted Lipotransfer for the Treatment of Stress Urinary Incontinence Via Endoscopically-Assisted Administration of Fat Tissue Micrografts Enriched by Autologous Adipose-Derived Regenerative Cells	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01850342
54	Hueso	Evaluation the Safety and Efficacy of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Tibial Closed Diaphyseal Fractures	Reclutamiento	Fase 2	NCT02140528
55	Hueso	Safety and Efficacy of Autologous Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Patient With Avascular Necrosis of the Femoral Head	Activo, no reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01643655
56	Hueso	Effectiveness of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells as Osteogenic Component in Composite Grafts (ROBUST)	Completado		NCT01532076
57	Hueso	Development of Bone Grafts Using Adipose Derived Stem Cells and Different Scaffolds: Impact of Pre-engineered Capillaries in Critical Size Grafts	Completado		NCT01218945
58	Méd. espinal	Safety and Effect of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cell Implantation in Patients With Spinal Cord Injury	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01769872
59	Méd. espinal	Safety of Autologous Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients With Spinal Cord Injury	Completado	Fase 1	NCT01274975
60	Méd. espinal	The Effect of Intrathecal Transplantation of Autologous Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells in the Patients With Spinal Cord Injury, Phase I Clinical Study	No consta	Fase 1	NCT01624779
61	Méd. espinal	A Phase II Study of Transplantation of Autologous Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) in Completely Acute Spinal Cord Injury.	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT02034669
62	Daño cardiaco	A Randomized Clinical Trial of adipose-Derived stEm & Regenerative Cells In the Treatment of Patients With Non revascularizable ischemic Myocardium - The PRECISE Trial	Completo	Fase 1	NCT00426868

63	Daño cardiaco	A Phase II Trial of Safety and Efficacy of ADI Patients With ST-elevation Acute Myocardial	Activo, no reclutamiento	Fase 2	NCT01216995	the Treatment
64	Daño cardiaco	Adipose-derived Regenerative Cells in the Treatment of Patients With Chronic Ischemic Heart Disease Not Amenable to Surgical or Interventional Revascularization II	Reclutamiento	Fase 2	NCT02052427	
65	Daño cardiaco	Adipose-derived Regenerative Cells in the Treatment of Patients With Chronic Ischemic Heart Disease Not Amenable to Surgical or Interventional Revascularization	Reclutamiento	Fase 2	NCT01556022	
66	Daño cardiaco	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Cardiovascular Effects of Intramyocardial and Intravenous Implantation of Autologous Adipose-Derived Stem Cells in Ischemic Congestive Heart Failure Patients	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01502514	
67	Daño cardiaco	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Cardiovascular Effects of Intramyocardial and Intravenous Implantation of Autologous Adipose-Derived Stem Cells in Non-Ischemic Congestive Heart Failure Patients	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01502501	
68	Daño cardiaco	A Randomized Clinical Trial of Adipose-derived Stem Cell in the Treatment of Patients With ST-elevation myocardial Infarction - The APOLLO Trial	Completo	Fase 1	NCT00442806	
69	Daño cardiaco	Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Patients With Chronic Myocardial Ischemia (MyStromalCell Trial)	Completo		NCT01449032	
70	Daño cardiaco	A Randomized Clinical Trial of adipose-derived Stem & Regenerative Cells In the Treatment of Patients With Non revascularizable ischemic Myocardium - The PRECISE Trial	Completo	Fase 1	NCT00426868	
71	Daño cardiaco	Adipose-derived Regenerative Cells in the Treatment of Patients With Chronic Ischemic Heart Disease Not Amenable to Surgical or Interventional Revascularization II	Reclutamiento	Fase 2	NCT02052427	
72	Daño cardiaco	Clinical Trial of Autologous Adipose Tissue Derived Stromal Cell Therapy for Ischemic Heart Failure	Reclutamiento		NCT01709279	
73	Daño cardiaco	A Phase II Trial of Safety and Efficacy of ADRCs Delivered Via the Intracoronary Route in the Treatment of Patients With ST-elevation Acute Myocardial Infarction - The ADVANCE Study	Activo, no reclutamiento	Fase 2	NCT01216995	
74	Daño cardiaco	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Cardiovascular Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Implantation by a Catheter Delivery System and/or Intravenously In Patients During the Acute Recovery Phase of ST-Elevation Myocardial Infarction	Activo, no reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01257776	
75	Isquemia miembros	Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells for Critical Limb Ischemia in Diabetic Patients	No consta		NCT01257776	
76	Isquemia miembros	Safety of Autologous Adipose Derived Stroma/ Stem Cells to Treat Critical Leg Ischemia (ACELLDream for Adipose Cell Derived Regenerative Endothelial Angiogenic Medicine)	Completo		NCT01211028	
77	Isquemia	Clinical Trial Phase I / II, Multicentre, Open,	Activo, no	Fase	NCT01745744	

	miembros	Randomized Study of the Use of Mesenchymal Stem Cells From Adipose-Tissue (CeTMAd) as Cell Regeneration Therapy in Critical Chronic Ischemic Syndrome of Lower Limb in Nondiabetic Patients.	reclutamiento	1 y 2	
78	Isquemia miembros	Autologous Adipose-Derived Stromal Cell Delivered Via Intramuscular Injections for the Treatment of Critical Limb Ischemia	Reclutamiento		NCT02099500
79	Isquemia miembros	Effects of Adipose Tissue Derived Stem Cells Implantation in Patients With Critical Limb Ischemia	Completo	Fase 1 y 2	NCT01663376
80	Isquemia miembros	A Prospective, Multicentric, Phase I/II, Open Label, Randomized, Interventional Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Intramuscular and Intravenous Administration of Autologous ADMSCS for Treatment of Critical Limb Ischemia (CLI).	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT02145897
81	Isquemia miembros	Phase IIa Clinical Trial to Safety of Treatment in Critical Ischemia Nonrevascularizable Lower Limb by Mesenchymal Stem Cells	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01824069
82	Enfermedad pulmonar	Safety, Tolerability and Preliminary Efficacy of Adipose Derived Stem Cells for Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Reclutamiento		NCT02161744
83	Enfermedad pulmonar	An Open-label, Non-Randomized, Multi-center Study to Assess the Safety and Effects of Intravenous Implantation of Liposuction Derived Autologous Adipose-derived Stem Cells in Subjects With Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT02216630
84	Enfermedad pulmonar	Phase I Study of Allogeneic Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells in Acute Respiratory Distress Syndrome	Reclutamiento	Fase 1	NCT01902082
85	Enfermedad pulmonar	Evaluate Safety and Efficacy of Intravenous Autologous ADMSc for Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis	Reclutamiento		NCT02135380
86	Enfermedad pulmonar	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Intra-venous Implantation of Autologous Adipose-Derived Stem Cells in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Reclutamiento	Fase 1 y 2	NCT01559051
87	Enfermedad pulmonar	An Open-label, Non-Randomized, Multi-Center Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells Delivered Intravenously in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Reclutamiento		NCT02041000
88	Cirugía Plástica	Grafting of Autologous Adipose Stromal Cell Trial	Reclutamiento	Fase 2	NCT02116933
89	Cirugía Plástica	Phase 1 Study of Autologous-Derived Stem Cell Transplantation in Patients With Lipodystrophy	No consta	Fase 1	NCT00715546
90	Cirugía Plástica	Safety Study of Filler Agent Composed of Autologous Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid (LipAge)	Reclutamiento		NCT02034786
91	Cirugía Plástica	Safety and Efficacy of Autologous Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Patient With Buerger's Disease	Completado	Fase 1 y 2	NCT01302015
92	Cirugía Plástica	Immunophenotyping of Fresh Stromal Vascular Fraction From Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) Enriched Fat Grafts for Refinements of Reconstructed Breasts	Reclutamiento	Fase 2	NCT01771913
93	Cirugía Plástica	A Phase One, Open Label, Single Arm Study to Demonstrate the Safety of Antria Cell	Reclutamiento	Fase 1	NCT01828723

		Preparation Process During Facial Fat Grafting Assisted With Autologous, Adipose Derived Stromal Vascular Fraction (SVF)					
94	Cirugía Plástica		Pilot Study of Skin Quality Improvement After Adipose-derived Stem Cell Transfer in Irradiated Breasts	Reclutamiento			NCT01801878
95	Cirugía Plástica		Preliminary Investigation of the Effect of Human Adipose-Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell in Progressive Hemifacial Atrophy(Romberg's Disease)	Completado	Fase 2		NCT01309061
96	Cirugía Plástica		Investigation of Adipose-Derived Stem Cells in Human Lipoaspirate	Reclutamiento			NCT01399307
97	Cirugía Plástica		19F Hot Spot MRI of Human Adipose-derived Stem Cells for Breast Reconstruction (CS-1000)	Completado			NCT02035085
98	Cirugía Plástica		A Clinical Evaluation Of Adipose Derived Regenerative Cells In The Treatment Of Patients With BrEast Deformities Post Segmental Breast ResecTion (Lumpectomy) With Or Without Radiation ThErapy. A Phase IV Post Market Study.	Completado	Fase 4		NCT00616135
99	Cicatrización		Treatment of Hypertensive Leg Ulcer by Adipose- Tissue Grafting	Reclutamiento			NCT01932021
100	Cicatrización		Adipose-Derived Regenerative Cellular Therapy of Chronic Wounds	Activo, no reclutamiento	Fase 2		NCT02092870
101	Cicatrización		The Role of Lipoaspirate Injection in the Treatment of Diabetic Lower Extremity Wounds and Venous Stasis Ulcers	No consta			NCT00815217
102	Cicatrización		A Phase II/III Clinical Study of ANTG-adip for the Treatment of Depressed Scar to Evaluate Safety and Efficacy	Completo	Fase 2 y 3		NCT00992147
103	Fistula Cronh	anal	Study of Allogenic Adipose-derived Stem Cells in Crohn's Fistula (ALLO-ASC)	No consta			NCT01440699
104	Fistula Cronh	anal	Treatment of Fistulous Crohn's Disease by Implant of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue	Activo, reclutando	no Fase 1 y 2		NCT01157650
105	Fistula Cronh	anal	Randomized, Single-blind, Placebo Controlled Multicenter Phase III Study to Assess the Efficacy and Safety of Expanded Autologous Adipose-derived Stem Cells (ASCs) (CX-401), for Treatment of Complex Perianal Fistulas in Perianal Crohn's Disease		Fase 3		NCT01378390
106	Fistula Cronh	anal	A Phase I Dose Escalation Clinical Study of ADIPOPLUS (Autologous Cultured Adeipose-derived Stem Cell) for the Treatment of Crohn's Fistula to Evaluate Safety and Efficacy	Completo	Fase 1		NCT00992485
107	Fistula Cronh	anal	Clinical Trial in Phase I-IIa to Study the Feasibility and Security of the Allogenic Use of Adipose-derived Stem Cells for the Local Treatment of Recto-vaginal Fistula in Crohn's Disease	Completo	Fase 2		NCT00999115
108	Fistula Cronh	anal	A Phase III, Randomized, Double Blind, Parallel Group, Placebo Controlled, Multicentre Study to Assess Efficacy and Safety of Expanded Allogeneic Adipose-derived Stem Cells (eASCs) for the Treatment of Perianal Fistulising Crohn's Disease Over a Period of 24 Weeks and an Extended Follow-up Period up to 52 Weeks.	Reclutamiento	Fase 3		NCT01541579
109	Fistula Cronh	anal	A Phase II Clinical Study of ADIPOPLUS (Autologous Cultured Adipose-derived Stem Cell) for the Treatment of Crohn's Fistula to	Completo	Fase 2		NCT01011244

Evaluate Safety and Efficacy						
110	Fistula Cronh	anal	Multicenter Phase I/IIa Study to Assess the Safety and Efficacy of Expanded Allogenic Adipose-derived Stem Cells (eASCs) (Cx601), for Treatment of Complex Perianal Fistulas in Perianal Crohn's Disease.	Completo	Fase 2	NCT01372969
111	Fistula Cronh	anal	Follow-up Study to Evaluate the Sustained Efficacy and Safety for the Patients With Adipoplus Injected in Phase II Clinical Trials(ANTG-ASC-202)	No consta		NCT01314079
112	Fístula Cronh	anal no	A Phase III Multicenter, Single Blind, Randomized, Comparative and add-on Clinical Trial, in Three Parallel Groups, to Evaluate Efficacy and Safety of a New Therapy With Adipose-derived Autologous Stem Cells for the Treatment of Complex Perianal Fistulas in Patients Without Inflammatory Bowel Disease	Completo	Fase 3	NCT00475410
113	Fístula Cronh	anal no	Phase II Study to Evaluate Efficacy and Safety of ANTG-ASC (Autologous Cultured Adipose-derived Stem Cells) on the Complex Fistula Patients	No consta	Fase 2	NCT01314092
114	Fístula Cronh	anal no	A Follow-up Study to Evaluate the Sustained Healing Effect the Patients Who Showed Complete Closure of Fistula the Previous ANTG-ASC-210 Study	No consta		NCT01623453
115	Fístula Cronh	anal no	A Phase II Clinical Trial to Study the Feasibility and Safety of Stromal Vascular Derived From Adipose Tissue for the Treatment of Recto-vaginal Fistula	No consta	Fase 1 y 2	NCT01548092
116	Fístula Cronh	anal no	A Phase IIa Clinical Trial to Study the Treatment of the Extremely Complex and Conventional Treatment Resistant Perianal Fistulae With Autologous Stem Cells From Lipoaspirate	No consta	Fase 2	NCT01586715
117	Fístula Cronh	anal no	A Phase II Clinical Trial to Study the Feasibility and Safety of Stromal Vascular Derived From Adipose Tissue for the Treatment of Enterocutaneous Fistula	No consta	Fase 1 y 2	NCT01584713
118	Fístula Cronh	anal no	A Prospective Study for the Assessment of the Long-term Safety and Efficacy of Cx401 in Patients Taking Part in the FATT-1 Trial	Completo		NCT01020825
119	Fístula Cronh	anal no	Multicentre,Randomized,Comparative,Add-on,Into Two Parallel Groups Clinical Trial to Evaluate Efficacy and Safety of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived From Expanded Adipose Tissue (ASC), for Treatment of Complex Perianal Fistulizing Disease in Patients Without IBD.	Reclutamiento	Fase 3	NCT01803347
120	Fístula Cronh	anal no	Phase II Clinical Trial, Multicentre, Randomised and Comparative, to Evaluate the Efficacy and Safety of a New Therapy With Autologous Stem Cells Derived From Lipoaspirates for the Non-Surgical Treatment of Complex Perianal Fistula	No consta	Fase 2	NCT00115466

VIII.2. ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Characterization of hASC and use of them in regenerative medicine and tissue engineering projects.

A. PURPOSE AND BACKGROUND

Dra Carmen Escobedo Lucea, is collecting biological samples from surgeries for liposurgeries and lipectomies with aesthetic aims.

If you let us, we would like to store some of your leftover biological sample and review your medical record. You are being asked to participate in this research because you are scheduled to undergo plastic surgery.

B. WHAT WILL HAPPEN

If you agree to be in this research, the following will happen:

1. After all routine tests required for your care are finished, instead of discarding your leftover biological sample, Dra Carmen Escobedo Lucea will save it in a "Tissue Bank" for research.
2. We will also collect and save information from your medical record, concerning things like age, sex, part of the body treated, and treatments received.
3. Biological samples will be used for the isolation and establishment of human adipose stem cell lines. The aim will be use them for characterization of new cell markers and isolation of different subpopulations. The cultures obtained will be employed for the realization of research projects in regenerative medicine and tissue engineering performed by Dra. Escobedo and co-workers at both University of Helsinki and University of Valencia.
4. We may transfer biological samples and/or cell lines created from it, along with certain medical information about you (sex, age and treatment received) to other collaborator scientists from outside institutions (University of Helsinki), but we will not give them your name or any other information that would identify you. The research will not change the care you receive. Your specimen and any information about you will be kept until it is used up or destroyed. It may be used to develop new drugs, tests, treatments or products. In some instances these may have potential commercial value. Your personal health information cannot be used for additional research without additional approval from either you or a review committee.
5. If you decide later that you do not want your sample and information to be used for future research, you can tell us, and we will destroy any remaining identifiable sample and information about it.

C. RISKS

1. There will be no additional risk due to the removal of biological samples for the Dra Escobedo-Lucea and co-workers research projects. By routine, the adipose tissue obtained during this kind of surgeries is discarded after the procedure.

2. Confidentiality: Information about you will be handled confidentially. All records will be coded and maintained in a secured database. Only a non-identifying code number will be used in any studies or reports performed.

D. BENEFITS

There will be no direct benefit to you from allowing your biological sample to be used for research. However, we hope we will learn something that will help in the development of tissue engineering techniques.

E. FINANCIAL CONSIDERATIONS

You will not be charged for being in this research. You will not be paid for being in this research. If any new products, tests or discoveries that result from this research have potential commercial value, you will not share in any financial benefits.

F. CONSENT

You have been given copies of this consent form and the Experimental Subject's Bill of Rights to keep. PARTICIPATION IN RESEARCH IS VOLUNTARY. You have the right to choose whether or not to be in this study. Your choice will not affect your medical care in any way.

If you wish to donate your samples for this research, please sign below.

Subject's Signature for Consent Date

If you wish to authorize access, use, creation, and disclosure of protected health information about you as discussed in sections B and C of this form, you should sign below. If you do not sign this form, the researchers will not collect identifiable information about you.

VIII.3. ANEXO 3. TAB. 3. TABLA DE CEBADORES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

MARCADORES	SECUENCIA CEBADOR FORWARD	SECUENCIA DE CEBADOR REVERSE	Tm °C	TAMAÑO AMPLICÓ N (pb)
GENES DE EXPRESIÓN CONSTITUTIVA				
<i>β</i>-2-microglobulina (B2M)	CTCGCGCTACTCTCTCTTT CTG	GCTTACATGTCTCGATCCC ACT	60	335
<i>β</i>-Actina	TTCTACAATGAGCTGCGT GTG	GGGGTGTGAAGGTCTCA AA	60	122
INDIFERENCIACIÓN TEMPRANA				
Nanog	GGTGGCAGAAAAACA GG	CATCCCTGGTGGTAGGAA GA	60	100
Nanog (endogenous)	E GGA CT	GGACTGAGCTGGTTGCCT CAT	60	321
OCT 3/4	CCTGTCTCCGTCACCACT CT	CAAAAACCCTGGCACAAA CT	60	128
TERT	GACCTCCATCAGAGCCAG TC	CGCAAGACCCCAAAGAGT T	60	84
FOXD3	CAGAGCCCGCAGAAGAAG	CGAAGCAGTCGTTGAGTG AG	60	133
FLK1 (KDR)	GTGTTTGCTCTGGTGGAG GT	TTAGCCCAACTCGAAGAA CA	54	105
MELK	CTTGGATCAGAGGCAGAT GTTTG	GTTGTAATCTTGCATGATC CAGG	60	249
REX1	AAGGCACTGAACGAGGAG AA	CTGAGCAGAAAGCTGGTC TT	53	206
ABCG2	GGTTTCTTCTTCTGAC GACC	TGGTTGTGAGATTGACCA ACAGACC	58	399
SSEA-1	TCATTCTACTAACTGGCAC CCTAA	CTTTCTCTGATTCTGGTT TTCTG	60	126
MESENQUIMALES				
CD13	CTCTCGATGGACAATGAA CG	ATCTGCTGCCCTGTTGATT C	60	100
CD29	TGCCCATCTTGTTCACAC	CAGAGTCAAGACATCCGA TTTAAG	60	137
CD44	AGAAGGTGTGGCAGAAG AA	AAATGCACCATTTCCTGAG A	50	116
CD73	CTTAACGTGGGAGTGGAA CC	TCTAGCTGCCATTTGCACA C	60	102
CD90	CGCTCTCCTGCTAACAGT CTT	CAGGCTGAACTCGTACTG GA	60	142
CD105	CTAACTGGCAGGGGAGAC AG	CTCCATGTGGCAGGAGCT A	60	101
CD166 (ALCAM)	ATTGAAGTTTTATTTGGCA GGAA	GGCTTAGCCATGCAAAAC A	60	102
CD117 (C-KIT)	TCATGGTCGGATCACAAA GA	AGGGGCTGCTTCCTAAAG AG	60	206
HEMATOPOYETICOS Y ENDOTELIALES				
CD14	TCCAAGACAGAATAATGAA TGGAC	CGAAAAGTCCTCAACGTC CT	60	76
CD34	TCTGGATCAAAGTAGGCA GGA	GATCCAGCCTCAGAGGAA GA	60	96

CD45	ACAGCTCTGCTGCCTTAC CT	GGGCTCAGAGTGGTTGTT TC	60	100
CD133	TCTCTATGTGGTACAGCC G	TGATCCGGGTTCTTACCT G	60	350
CD144	TCGTCATGGACCGAGGTT	TTGGTTAAAACAAACAAGT CAGTGT	60	87
ADIPOCITOS				
ADFP	CCTGCTCTTCGCCTTTTCG CT	CTTCACACCGTTCTCTGCC A	60	218
LPL	CAAAGCCCTGCTCGTGCT GA	CAGCCAGTCCACCACAAT GA	60	334
Adiponectin	TCCTTACAGAACACGCTTT CA	AGGGCCACAGAACGAGAG	60	501
AP2 (FABP4)	ATTGGGATGGAAAATCAA CCA	GTGGAAGTGACGCCTTTC AT	60	88
PPARG	TCAGCGGGAAGGACTTTA TGTATG	TCAGGTTTGGGCGGATGC	60	147
Perilipin (PLIN)	GCAGTCAACAAAGGCCTC AC	AAGCTACTGGCGCTCTGC AC	60	200
ADD1	GGAGCCATGGATTGCACT TTC	ATCCTTCAATGGAGTGGG TGCAG	60	261
Leptin (LEP)	AATGCATTGGGGAACCCT GT	CCAGGTCGTTGGATATTT GG	60	305
ANGIOGÉNESIS				
CD31	CTTGAGTGGGTGGGAGAG AG	TGTCACTGAGGCAAACAG GA	60	101
CARTILAGO				
Aggrecan variant 1 (AG1)	GCAGAGACGCATCTAGAA ATT	GGTAATTGCAGGGAACAT CAT	55	502
Aggrecan variant 2 (AG2)	GCAGAGACGCATCTAGAA ATT	GGTAATTGCAGGGAACAT CAT	55	616
Decorin (Dec),	CCTTTGGTGAAGTTGGAA CG	AAGATGTAATTCCGTAAGG G	55	306
Biglycan (BG)	TGCAGAACAACGACATCT CC	AGCTTGGAGTAGCGAAGC AG	60	346
Collagen, type X, alpha 1 (CN10)	TGGAGTGGGAAAAAGAGG TGG	TCCTCCAACCTCCAGGATC A	60	599
HUESO				
Osteonectin (ON)	TGTGGGAGCTAATCCTGT CC	TCAGGACGTTCTTGAGCC AGT	60	401
Collagen, type I, alpha 1 (CN1)	GAGAGAGAGGCTTCCCTG GT	CACCACGATCACCCTCTT G	60	300
Alkaline phosphatase (AP)	TGAAATATGCCCTGGAGC	TCACGTTGTTCTGTTTAG	54	804
Rretinoid X receptor, alpha (RXR)	ACATGGCTTCCTTCACCAA G	CAGCTCAGCCTCCAGGAT CC	60	344
Vitamin D () receptor (VDR)	CTCGTCCAGTTCTCCAAT C	GCTCCTCCTCATGCAAGTT C	60	395
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (c-FOS)	CCTGTCAAGAGCATCAGC AG	GTCAGAGGAAGGCTCATT GC	60	348
Msh homeobox	TTACCACATCCCAGCTCCT	GCATAGGTTTTGCAGCCA	60	201

2 (MSX2)	C		TT		
Distal-less homeobox (DLX5)	5	TTGCCCGAGTCTTCAGCT AC	TCTTTCTCTGGCTGGTTGG T	60	254
Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)		AGACCTGTATCGCAGGCA CT	CCAACCTGGTGTCCAAAA GT	60	350
Parathyroid hormone receptor (PTH1R)	1	CCGTAGCTGTGCTCATCC T	CCCTCCACCAGAATCCAG TA	60	302
Runt-related transcription factor (RUNX2), (CBF1a)	2	CTCACTACCACACCTACCT G	TCAATATGGTCGCCAAACA GATTC	60	320
NEUROECTODERMO					
MAP2		ATTCCGAGGTTCCAACAC AC	ACCAGCCATTGAAGAAAT GC	60	102
GFAP		TGCGGTCCCTTCTTACTCA C	CCTCCCAGTCCCATCTCT G	60	232
SOX17		CCTGGGTTTTTGTGTTGC T	GAGGAAGCTGTTTTGGGA CA	60	212
ENDODERMO					
AFP		AGAACCTGTCACAAGCTG TG	GACAGCAAGCTGAGGATG TC	60	675
CXCR4		GGTGGTCTATGTTGGCGT CT	TGGAGTGTGACAGCTTGG AG	54	227
HNF1α		CCATCCTCAAAGAGCTGG AG	CTGGTTGAGGCCAGTGGT AT	60	173
HNF3β		CTACGCCAACATGAACTC CA	CGGTAGAAGGGGAAGAG GTC	60	213
NGN3		CAATCGAATGCACAACCT CA	GGGAGACTGGGGAGTAGA GG	60	254
PAX6		CCGAGAGTAGCGACTCCA G	CTTCCGGTCTGCCCGTTC	60	239
SOX17		CCTGGGTTTTTGTGTTGC T	GAGGAAGCTGTTTTGGGA CA	60	212
TTR		ATGGCTTCTCATCGTCTGC T	TGTCATCAGCAGCCTTTCT G	60	178

BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aasen, T., A. Raya, M. J. Barrero, E. Garreta, A. Consiglio, F. Gonzalez, R. Vassena, J. Bilic, V. Pekarik, G. Tiscornia, M. Edel, S. Boue and J. C. Izpisua Belmonte (2008). "Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes." Nat Biotechnol **26**(11): 1276-1284.

Alvarez, P. D., M. Garcia-Arranz, T. Georgiev-Hristov and D. Garcia-Olmo (2008). "A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells." Thorax **63**(4): 374-376.

Alvi, A. J., H. Clayton, C. Joshi, T. Enver, A. Ashworth, M. M. Vivanco, T. C. Dale and M. J. Smalley (2003). "Functional and molecular characterisation of mammary side population cells." Breast Cancer Res **5**(1): R1-8.

Anderson, G. B., R. H. BonDurant, L. Goff, J. Groff and A. L. Moyer (1996). "Development of bovine and porcine embryonic teratomas in athymic mice." Anim Reprod Sci **45**(3): 231-240.

Andrews, P. W. (2002). "From teratocarcinomas to embryonic stem cells." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1420): 405-417.

Anjos-Afonso, F. and D. Bonnet (2007). "Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment." Blood **109**(3): 1298-1306.

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

Ashjian, P. H., A. S. Elbarbary, B. Edmonds, D. DeUgarte, M. Zhu, P. A. Zuk, H. P. Lorenz, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2003). "*In vitro* differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors." Plast Reconstr Surg **111**(6): 1922-1931.

Badiavas, E. V., D. Ford, P. Liu, N. Kouttab, J. Morgan, A. Richards and A. Maizel (2007). "Long-term bone marrow culture and its clinical potential in chronic wound healing." Wound Repair Regen **15**(6): 856-865.

Bae, J. S., J. E. Carter and H. K. Jin (2010). "Adipose tissue-derived stem cells rescue Purkinje neurons and alleviate inflammatory responses in Niemann-Pick disease type C mice." Cell Tissue Res **340**(2): 357-369.

Balkin, D. M., S. Samra and D. M. Steinbacher (2014). "Immediate fat grafting in primary cleft lip repair." J Plast Reconstr Aesthet Surg **67**(12): 1644-1650.

Barile, L., I. Chimenti, R. Gaetani, E. Forte, F. Miraldi, G. Frati, E. Messina and A. Giacomello (2007). "Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4 Suppl 1**: S9-S14.

Barton, M. (2014). "Aging and Endothelin: Determinants of Disease." Life Sci.

Barton, M. (2014). "Aging and endothelin: determinants of disease." Life Sci **118**(2): 97-109.

- Battula, V. L., P. M. Bareiss, S. Treml, S. Conrad, I. Albert, S. Hojak, H. Abele, B. Schewe, L. Just, T. Skutella and H. J. Buhring (2007). "Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation." Differentiation **75**(4): 279-291.
- Battula, V. L., S. Treml, H. Abele and H. J. Buhring (2008). "Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody." Differentiation **76**(4): 326-336.
- Bersenev, A. (2014). "Trends in cell therapy clinical trials 2011 – 2013." CellTrials blog.
- Bhatt, R. I., M. D. Brown, C. A. Hart, P. Gilmore, V. A. Ramani, N. J. George and N. W. Clarke (2003). "Novel method for the isolation and characterisation of the putative prostatic stem cell." Cytometry A **54**(2): 89-99.
- Bhattacharya, S., J. D. Jackson, A. V. Das, W. B. Thoreson, C. Kuszynski, J. James, S. Joshi and I. Ahmad (2003). "Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(6): 2764-2773.
- Bieback, K., A. Hecker, A. Kocaomer, H. Lannert, K. Schallmoser, D. Strunk and H. Kluter (2009). "Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow." Stem Cells **27**(9): 2331-2341.
- Bihl, F. and F. Negro (2010). "Hepatitis E virus: a zoonosis adapting to humans." J Antimicrob Chemother **65**(5): 817-821.
- Bjornson, C. R., R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli and A. L. Vescovi (1999). "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*." Science **283**(5401): 534-537.
- Bonora-Centelles, A., J. V. Castell and M. J. Gomez-Lechon (2008). "[Adipose tissue-derived stem cells: hepatic plasticity]." Gastroenterol Hepatol **31**(5): 299-309.
- Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet and H. M. Blau (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." Science **290**(5497): 1775-1779.
- Bunnell, B. A., M. Flaat, C. Gagliardi, B. Patel and C. Ripoll (2008). "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation." Methods **45**(2): 115-120.
- Bunting, K. D. (2002). "ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells." Stem Cells **20**(1): 11-20.
- Camargo, F. D., S. M. Chambers and M. A. Goodell (2004). "Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion." Cell Prolif **37**(1): 55-65.
- Camargo, F. D., R. Green, Y. Capetanaki, K. A. Jackson and M. A. Goodell (2003). "Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates." Nat Med **9**(12): 1520-1527.
- Cao, Y., Z. Sun, L. Liao, Y. Meng, Q. Han and R. C. Zhao (2005). "Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization *in vivo*." Biochem Biophys Res Commun **332**(2): 370-379.
- Capela, A. and S. Temple (2002). "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal." Neuron **35**(5): 865-875.

Clarke, D. L., C. B. Johansson, J. Wilbertz, B. Veress, E. Nilsson, H. Karlstrom, U. Lendahl and J. Frisen (2000). "Generalized potential of adult neural stem cells." Science **288**(5471): 1660-1663.

Cooray, H. C., C. G. Blackmore, L. Maskell and M. A. Barrand (2002). "Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain." Neuroreport **13**(16): 2059-2063.

Cygalova, L., M. Ceckova, P. Pavek and F. Staud (2008). "Role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in fetal protection during gestation in rat." Toxicol Lett **178**(3): 176-180.

Chen, Z., F. Liu, Q. Ren, Q. Zhao, H. Ren, S. Lu, L. Zhang and Z. Han (2010). "Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation." Int J Cancer **126**(4): 841-851.

D'Amour, K. A., A. D. Agulnick, S. Eliazer, O. G. Kelly, E. Kroon and E. E. Baetge (2005). "Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm." Nat Biotechnol **23**(12): 1534-1541.

Dash, N. R., S. N. Dash, P. Routray, S. Mohapatra and P. C. Mohapatra (2009). "Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Rejuvenation Res **12**(5): 359-366.

Dazzi, F., R. Ramasamy, S. Glennie, S. P. Jones and I. Roberts (2006). "The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis." Blood Rev **20**(3): 161-171.

De Coppi, P., G. Bartsch, Jr., M. M. Siddiqui, T. Xu, C. C. Santos, L. Perin, G. Mostoslavsky, A. C. Serre, E. Y. Snyder, J. J. Yoo, M. E. Furth, S. Soker and A. Atala (2007). "Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy." Nat Biotechnol **25**(1): 100-106.

De Francesco, F., V. Tirino, V. Desiderio, G. Ferraro, F. D'Andrea, M. Giuliano, G. Libondi, G. Pirozzi, A. De Rosa and G. Papaccio (2009). "Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries." PLoS One **4**(8): e6537.

de la Portilla, F., F. Alba, D. Garcia-Olmo, J. M. Herrerias, F. X. Gonzalez and A. Galindo (2013). "Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial." Int J Colorectal Dis **28**(3): 313-323.

Deans, R. J. and A. B. Moseley (2000). "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses." Exp Hematol **28**(8): 875-884.

Doyle, L. A., W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A. K. Rishi and D. D. Ross (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-15670.

Dragoo, J. L., G. Carlson, F. McCormick, H. Khan-Farooqi, M. Zhu, P. A. Zuk and P. Benhaim (2007). "Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells." Tissue Eng **13**(7): 1615-1621.

Edlund, T. and T. M. Jessell (1999). "Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system." Cell **96**(2): 211-224.

- Erickson, G. A., S. R. Bolin and J. G. Landgraf (1991). "Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns." Dev Biol Stand **75**: 173-175.
- Escobedo-Lucea, C., C. Bellver, C. Gandia, A. Sanz-Garcia, F. J. Esteban, V. Mirabet, G. Forte, I. Moreno, M. Lezameta, A. Ayuso-Sacido and J. M. Garcia-Verdugo (2013). "A xenogeneic-free protocol for isolation and expansion of human adipose stem cells for clinical uses." PLoS One **8**(7): e67870.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Fang, B., Y. Song, N. Li, J. Li, Q. Han and R. C. Zhao (2009). "Mesenchymal stem cells for the treatment of refractory pure red cell aplasia after major ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation." Ann Hematol **88**(3): 261-266.
- Fetsch, P. A., A. Abati, T. Litman, K. Morisaki, Y. Honjo, K. Mittal and S. E. Bates (2006). "Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues." Cancer Lett **235**(1): 84-92.
- Figeac, N., M. Daczewska, C. Marcelle and K. Jagla (2007). "Muscle stem cells and model systems for their investigation." Dev Dyn **236**(12): 3332-3342.
- Finan, A., N. Sopko, F. Dong, B. Turturice, M. Kiedrowski and M. S. Penn (2013). "Bone marrow SSEA1+ cells support the myocardium in cardiac pressure overload." PLoS One **8**(7): e68528.
- Firulli, A. B. and E. N. Olson (1997). "Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity." Trends Genet **13**(9): 364-369.
- Fischer, L. J., S. McIlhenny, T. Tulenko, N. Golesorkhi, P. Zhang, R. Larson, J. Lombardi, I. Shapiro and P. J. DiMuzio (2009). "Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force." J Surg Res **152**(1): 157-166.
- Flamme, I. and W. Risau (1992). "Induction of vasculogenesis and hematopoiesis *in vitro*." Development **116**(2): 435-439.
- Forbes, S. J., P. Vig, R. Poulson, N. A. Wright and M. R. Alison (2002). "Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible." Clin Sci (Lond) **103**(4): 355-369.
- Fraser, J. K., R. Schreiber, B. Strem, M. Zhu, Z. Alfonso, I. Wulur and M. H. Hedrick (2006). "Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3 Suppl 1**: S33-37.
- Fraser, J. K., M. Zhu, I. Wulur and Z. Alfonso (2008). "Adipose-derived stem cells." Methods Mol Biol **449**: 59-67.
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja and N. N. Kulagina (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol **4**(5): 267-274.
- Fuchs, E. and J. A. Segre (2000). "Stem cells: a new lease on life." Cell **100**(1): 143-155.
- Garcia-Olmo, D., M. Garcia-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro and J. A. Rodriguez-Montes (2005). "A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation." Dis Colon Rectum **48**(7): 1416-1423.

Gearhart, J. D. and B. Mintz (1974). "Contact-mediated myogenesis and increased acetylcholinesterase activity in primary cultures of mouse teratocarcinoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(5): 1734-1738.

Geneser, F. (2000). Histología.

Georgiev-Hristov, T., M. Garcia-Arranz and D. Garcia-Olmo (2013). "Adipose tissue-derived products for complex fistula treatment." Tech Coloproctol **17**(6): 675-676.

Gimble, J. and F. Guilak (2003). "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential." Cytotherapy **5**(5): 362-369.

Gimble, J. M., A. J. Katz and B. A. Bunnell (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res **100**(9): 1249-1260.

Gonzalez-Rey, E., P. Anderson, M. A. Gonzalez, L. Rico, D. Buscher and M. Delgado (2009). "Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis." Gut **58**(7): 929-939.

Gonzalez-Rey, E., M. A. Gonzalez, N. Varela, F. O'Valle, P. Hernandez-Cortes, L. Rico, D. Buscher and M. Delgado (2010). "Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells *in vitro* in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **69**(1): 241-248.

Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner and R. C. Mulligan (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*." J Exp Med **183**(4): 1797-1806.

Heiskanen, A., T. Satomaa, S. Tiitinen, A. Laitinen, S. Mannelin, U. Impola, M. Mikkola, C. Olsson, H. Miller-Podraza, M. Blomqvist, A. Olonen, H. Salo, P. Lehenkari, T. Tuuri, T. Otonkoski, J. Natunen, J. Saarinen and J. Laine (2007). "N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible." Stem Cells **25**(1): 197-202.

Helder, M. N., M. Knippenberg, J. Klein-Nulend and P. I. Wuisman (2007). "Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine." Tissue Eng **13**(8): 1799-1808.

Higgins, C. F. (1995). "The ABC of channel regulation." Cell **82**(5): 693-696.

Hirschmann-Jax, C., A. E. Foster, G. G. Wulf, J. G. Nuchtern, T. W. Jax, U. Gobel, M. A. Goodell and M. K. Brenner (2004). "A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14228-14233.

Horwitz, E. M., D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz and M. K. Brenner (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." Nat Med **5**(3): 309-313.

Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." Nat Protoc **4**(1): 44-57.

Hussain, S. Z., S. C. Strom, M. R. Kirby, S. Burns, S. Langemeijer, T. Ueda, M. Hsieh and J. F. Tisdale (2005). "Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells *in vitro*." Dig Dis Sci **50**(10): 1755-1763.

Jackson, K. A., T. Mi and M. A. Goodell (1999). "Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14482-14486.

Jakob, H., T. Boon, J. Gaillard, J. Nicolas and F. Jacob (1973). "[Teratocarcinoma of the mouse: isolation, culture and properties of pluripotential cells]." Ann Microbiol (Paris) **124**(3): 269-282.

Jang, S., H. H. Cho, Y. B. Cho, J. S. Park and H. S. Jeong (2010). "Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin." BMC Cell Biol **11**: 25.

Jiang, T., W. Liu, X. Lv, H. Sun, L. Zhang, Y. Liu, W. J. Zhang, Y. Cao and G. Zhou (2010). "Potent *in vitro* chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells." Biomaterials.

Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-49.

Jo, C. H., Y. G. Lee, W. H. Shin, H. Kim, J. W. Chai, E. C. Jeong, J. E. Kim, H. Shim, J. S. Shin, I. S. Shin, J. C. Ra, S. Oh and K. S. Yoon (2014). "Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial." Stem Cells **32**(5): 1254-1266.

Jonker, J. W., G. Merino, S. Musters, A. E. van Herwaarden, E. Bolscher, E. Wagenaar, E. Mesman, T. C. Dale and A. H. Schinkel (2005). "The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk." Nat Med **11**(2): 127-129.

Kahan, B. W. and B. Ephrussi (1970). "Developmental potentialities of clonal *in vitro* cultures of mouse testicular teratoma." J Natl Cancer Inst **44**(5): 1015-1036.

Kamao, H., M. Mandai, S. Okamoto, N. Sakai, A. Suga, S. Sugita, J. Kiryu and M. Takahashi (2014). "Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application." Stem Cell Reports **2**(2): 205-218.

Kang, S. K., D. H. Lee, Y. C. Bae, H. K. Kim, S. Y. Baik and J. S. Jung (2003). "Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats." Exp Neurol **183**(2): 355-366.

Kato, K., T. Takao, A. Kuboyama, Y. Tanaka, T. Ohgami, S. Yamaguchi, S. Adachi, T. Yoneda, Y. Ueoka, K. Kato, S. Hayashi, K. Asanoma and N. Wake (2010). "Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage." Am J Pathol **176**(1): 381-392.

Katz, A. J., A. Tholpady, S. S. Tholpady, H. Shang and R. C. Ogle (2005). "Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells." Stem Cells **23**(3): 412-423.

Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter and K. Bieback (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." Stem Cells **24**(5): 1294-1301.

Kim, M., I. Kim, S. K. Lee, S. I. Bang and S. Y. Lim (2011). "Clinical trial of autologous differentiated adipocytes from stem cells derived from human adipose tissue." Dermatol Surg **37**(6): 750-759.

Kleinsmith, L. J. and G. B. Pierce, Jr. (1964). "Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells." Cancer Res **24**: 1544-1551.

Knight, R. (2010). "The risk of transmitting prion disease by blood or plasma products." Transfus Apher Sci **43**(3): 387-391.

Kocaoemer, A., S. Kern, H. Kluter and K. Bieback (2007). "Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue." Stem Cells **25**(5): 1270-1278.

Koh, K. S., T. S. Oh, H. Kim, I. W. Chung, K. W. Lee, H. B. Lee, E. J. Park, J. S. Jung, I. S. Shin, J. C. Ra and J. W. Choi (2012). "Clinical application of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in progressive hemifacial atrophy (Parry-Romberg disease) with microfat grafting techniques using 3-dimensional computed tomography and 3-dimensional camera." Ann Plast Surg **69**(3): 331-337.

Kokai, L. E., J. P. Rubin and K. G. Marra (2005). "The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells." Plast Reconstr Surg **116**(5): 1453-1460.

Krause, D. S., N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel and S. J. Sharkis (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." Cell **105**(3): 369-377.

Krebsbach, P. H., S. A. Kuznetsov, P. Bianco and P. G. Robey (1999). "Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application." Crit Rev Oral Biol Med **10**(2): 165-181.

Krishnamurthy, P., D. D. Ross, T. Nakanishi, K. Bailey-Dell, S. Zhou, K. E. Mercer, B. Sarkadi, B. P. Sorrentino and J. D. Schuetz (2004). "The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme." J Biol Chem **279**(23): 24218-24225.

Kucia, M., E. K. Zuba-Surma, M. Wysoczynski, W. Wu, J. Ratajczak, B. Machalinski and M. Z. Ratajczak (2007). "Adult marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering." Expert Opin Biol Ther **7**(10): 1499-1514.

Kuhbier, J. W., B. Weyand, C. Radtke, P. M. Vogt, C. Kasper and K. Reimers (2010). "Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells." Adv Biochem Eng Biotechnol **123**: 55-105.

Langat, D. K. and J. M. Mwenda (2000). "Potential risks of viral infections in xenotransplantation." Acta Trop **76**(2): 147-158.

Lee, W. Y., K. J. Park, Y. B. Cho, S. N. Yoon, K. H. Song, S. Kim do, S. H. Jung, M. Kim, H. W. Yoo, I. Kim, H. Ha and C. S. Yu (2013). "Autologous adipose tissue-derived stem cells treatment demonstrated favorable and sustainable therapeutic effect for Crohn's fistula." Stem Cells **31**(11): 2575-2581.

Lemischka, I. R., D. H. Raulet and R. C. Mulligan (1986). "Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells." Cell **45**(6): 917-927.

Lendeckel, S., A. Jodicke, P. Christophis, K. Heidinger, J. Wolff, J. K. Fraser, M. H. Hedrick, L. Berthold and H. P. Howaldt (2004). "Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report." J Craniomaxillofac Surg **32**(6): 370-373.

Li, C. Y., X. Y. Wu, J. B. Tong, X. X. Yang, J. L. Zhao, Q. F. Zheng, G. B. Zhao and Z. J. Ma (2015). "Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy." Stem Cell Res Ther **6**: 55.

Lin, G., M. Garcia, H. Ning, L. Banie, Y. L. Guo, T. F. Lue and C. S. Lin (2008). "Defining stem and progenitor cells within adipose tissue." Stem Cells Dev **17**(6): 1053-1063.

Lindroos, B., K. L. Aho, H. Kuokkanen, S. Raty, H. Huhtala, R. Lemponen, O. Yli-Harja, R. Suuronen and S. Miettinen (2010). "Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum." Tissue Eng Part A **16**(7): 2281-2294.

Liu, T. M., Y. N. Wu, X. M. Guo, J. H. Hui, E. H. Lee and B. Lim (2009). "Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **18**(7): 1013-1022.

Loh, Y. H., S. Agarwal, I. H. Park, A. Urbach, H. Huo, G. C. Heffner, K. Kim, J. D. Miller, K. Ng and G. Q. Daley (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells from human blood." Blood **113**(22): 5476-5479.

Long, J. L., P. Zuk, G. S. Berke and D. K. Chhetri (2010). "Epithelial differentiation of adipose-derived stem cells for laryngeal tissue engineering." Laryngoscope **120**(1): 125-131.

Mackensen, A., R. Drager, M. Schlesier, R. Mertelsmann and A. Lindemann (2000). "Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells." Cancer Immunol Immunother **49**(3): 152-156.

Madonna, R., Y. J. Geng and R. De Caterina (2009). "Adipose tissue-derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(11): 1723-1729.

Mahmoudifar, N. and P. M. Doran "Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polyglycolic acid mesh scaffolds under dynamic culture conditions." Biomaterials.

Mahmoudifar, N. and P. M. Doran (2010). "Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polyglycolic acid mesh scaffolds under dynamic culture conditions." Biomaterials **31**(14): 3858-3867.

Majka, S. M., K. A. Jackson, K. A. Kienstra, M. W. Majesky, M. A. Goodell and K. K. Hirschi (2003). "Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration." J Clin Invest **111**(1): 71-79.

Mannello, F. and G. A. Tonti (2007). "Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum

replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!" Stem Cells **25**(7): 1603-1609.

Marappagounder, D., I. Somasundaram, R. S. Janvikula and S. Dorairaj (2012). "Long-term culture optimization of human omentum fat-derived mesenchymal stem cells." Cell Biol Int **36**(11): 1029-1036.

Marshall, V. S., M. A. Waknitz and J. A. Thomson (2001). "Isolation and maintenance of primate embryonic stem cells." Methods Mol Biol **158**: 11-18.

Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-7638.

Martin, M. J., A. Muotri, F. Gage and A. Varki (2005). "Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid." Nat Med **11**(2): 228-232.

Martinez-Lorenzo, M. J., M. Royo-Canas, E. Alegre-Aguaron, P. Desportes, T. Castiella, F. Garcia-Alvarez and L. Larrad (2009). "Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species." J Orthop Res **27**(11): 1499-1507.

Matsui, Y., K. Zsebo and B. L. Hogan (1992). "Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture." Cell **70**(5): 841-847.

Matsumoto, D., K. Sato, K. Gonda, Y. Takaki, T. Shigeura, T. Sato, E. Aiba-Kojima, F. Iizuka, K. Inoue, H. Suga and K. Yoshimura (2006). "Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection." Tissue Eng **12**(12): 3375-3382.

Metcalfe, A. D. and M. W. Ferguson (2008). "Skin stem and progenitor cells: using regeneration as a tissue-engineering strategy." Cell Mol Life Sci **65**(1): 24-32.

Mezey, E., S. Key, G. Vogelsang, I. Szalayova, G. D. Lange and B. Crain (2003). "Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1364-1369.

Mintz, B. and K. Illmensee (1975). "Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3585-3589.

Mitchell, J. B., K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z. E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu and J. M. Gimble (2006). "Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers." Stem Cells **24**(2): 376-385.

Mizuno, H. (2009). "Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review." J Nippon Med Sch **76**(2): 56-66.

Moreno, M. J. and J. A. Martinez (2002). "[Adipose tissue: a storage and secretory organ]." An Sist Sanit Navar **25 Suppl 1**: 29-39.

Muller, I., S. Kordowich, C. Holzwarth, C. Spano, G. Isensee, A. Staiber, S. Viebahn, F. Gieseke, H. Langer, M. P. Gawaz, E. M. Horwitz, P. Conte, R. Handgretinger and M.

- Dominici (2006). "Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM." Cytotherapy **8**(5): 437-444.
- Murohara, T. (2009). "Autologous adipose tissue as a new source of progenitor cells for therapeutic angiogenesis." J Cardiol **53**(2): 155-163.
- Naaijken, B. A., A. van Dijk, O. Kamp, P. A. Krijnen, H. W. Niessen and L. J. Juffermans (2014). "Therapeutic application of adipose derived stem cells in acute myocardial infarction: lessons from animal models." Stem Cell Rev **10**(3): 389-398.
- Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa and S. Yamanaka (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." Nat Biotechnol **26**(1): 101-106.
- Neupane, M., C. C. Chang, M. Kiupel and V. Yuzbasiyan-Gurkan (2008). "Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells." Tissue Eng Part A **14**(6): 1007-1015.
- Nicolas, J. F., P. Avner, J. Gaillard, J. L. Guenet, H. Jakob and F. Jacob (1976). "Cell lines derived from teratocarcinomas." Cancer Res **36**(11 Pt. 2): 4224-4231.
- Niehans, P. (1952). "20 years of cellular therapy. ." Med. Klin. **47**: 1-16.
- Noguchi, K., K. Katayama, J. Mitsuhashi and Y. Sugimoto (2009). "Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy." Adv Drug Deliv Rev **61**(1): 26-33.
- Orkin, S. H. (1998). "Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis." Int J Dev Biol **42**(7): 927-934.
- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, F. Limana, I. Jakoniuk, F. Quaini, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri and P. Anversa (2001). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10344-10349.
- Oswald, J., S. Boxberger, B. Jorgensen, S. Feldmann, G. Ehninger, M. Bornhauser and C. Werner (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*." Stem Cells **22**(3): 377-384.
- Perez-Tomas, R. (2006). "Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment." Curr Med Chem **13**(16): 1859-1876.
- Perin, E. C., R. Sanz-Ruiz, P. L. Sanchez, J. Lasso, R. Perez-Cano, J. C. Alonso-Farto, E. Perez-David, M. E. Fernandez-Santos, P. W. Serruys, H. J. Duckers, J. Kastrup, S. Chamuleau, Y. Zheng, G. V. Silva, J. T. Willerson and F. Fernandez-Aviles (2014). "Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial." Am Heart J **168**(1): 88-95 e82.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.
- Planat-Benard, V., J. S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud and

- L. Casteilla (2004). "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives." Circulation **109**(5): 656-663.
- Pollard, S., L. Conti and A. Smith (2006). "Exploitation of adherent neural stem cells in basic and applied neurobiology." Regen Med **1**(1): 111-118.
- Ponrartana, S., H. H. Hu and V. Gilsanz (2013). "On the relevance of brown adipose tissue in children." Ann N Y Acad Sci **1302**: 24-29.
- Poulsom, R., M. R. Alison, S. J. Forbes and N. A. Wright (2002). "Adult stem cell plasticity." J Pathol **197**(4): 441-456.
- Poulsom, R., S. J. Forbes, K. Hodivala-Dilke, E. Ryan, S. Wyles, S. Navaratnarasah, R. Jeffery, T. Hunt, M. Alison, T. Cook, C. Pusey and N. A. Wright (2001). "Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration." J Pathol **195**(2): 229-235.
- Prado-Lopez, S., A. Conesa, A. Arminan, M. Martinez-Losa, C. Escobedo-Lucea, C. Gandia, S. Tarazona, D. Melguizo, D. Blesa, D. Montaner, S. Sanz-Gonzalez, P. Sepulveda, S. Gotz, J. E. O'Connor, R. Moreno, J. Dopazo, D. J. Burks and M. Stojkovic (2010). "Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium." Stem Cells **28**(3): 407-418.
- Prosper, F., D. Stroncek and C. M. Verfaillie (1996). "Phenotypic and functional characterization of long-term culture-initiating cells present in peripheral blood progenitor collections of normal donors treated with granulocyte colony-stimulating factor." Blood **88**(6): 2033-2042.
- Pruszk, J., W. Ludwig, A. Blak, K. Alavian and O. Isacson (2009). "CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells." Stem Cells **27**(12): 2928-2940.
- Pruszk, J., K. C. Sonntag, M. H. Aung, R. Sanchez-Pernaute and O. Isacson (2007). "Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations." Stem Cells **25**(9): 2257-2268.
- Puissant, B., C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla and A. Blancher (2005). "Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells." Br J Haematol **129**(1): 118-129.
- Pulsatelli, L., O. Addimanda, V. Brusi, B. Pavloska and R. Meliconi (2013). "New findings in osteoarthritis pathogenesis: therapeutic implications." Ther Adv Chronic Dis **4**(1): 23-43.
- Qu-Petersen, Z., B. Deasy, R. Jankowski, M. Ikezawa, J. Cummins, R. Pruchnic, J. Mytinger, B. Cao, C. Gates, A. Wernig and J. Huard (2002). "Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration." J Cell Biol **157**(5): 851-864.
- Rada, T., R. L. Reis and M. E. Gomes (2009). "Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Their Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering." Tissue Eng Part B Rev.
- Radtke, C., B. Schmitz, M. Spies, J. D. Kocsis and P. M. Vogt (2009). "Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells." Int J Dev Neurosci **27**(8): 817-823.
- Rajashekhar, G. (2014). "Mesenchymal stem cells: new players in retinopathy therapy." Front Endocrinol (Lausanne) **5**: 59.

Rajashekhar, G., A. Ramadan, C. Abburi, B. Callaghan, D. O. Traktuev, C. Evans-Molina, R. Maturi, A. Harris, T. S. Kern and K. L. March (2014). "Regenerative therapeutic potential of adipose stromal cells in early stage diabetic retinopathy." PLoS One **9**(1): e84671.

Ramos, T. V., T. Wang, C. B. Maki, M. Pascual and F. Izadyar (2009). "Adipose stem cell side population in the mouse." J Tissue Eng Regen Med **3**(6): 430-441.

Read, T. A., M. P. Fogarty, S. L. Markant, R. E. McLendon, Z. Wei, D. W. Ellison, P. G. Febbo and R. J. Wechsler-Reya (2009). "Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma." Cancer Cell **15**(2): 135-147.

Rehman, J., D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine and K. L. March (2004). "Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells." Circulation **109**(10): 1292-1298.

Reyes, M., T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie and C. M. Verfaillie (2001). "Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells." Blood **98**(9): 2615-2625.

Rhee, W. J. and G. Bao (2009). "Simultaneous detection of mRNA and protein stem cell markers in live cells." BMC Biotechnol **9**: 30.

Rigotti, G., A. Marchi, M. Galie, G. Baroni, D. Benati, M. Krampera, A. Pasini and A. Sbarbati (2007). "Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells." Plast Reconstr Surg **119**(5): 1409-1422; discussion 1423-1404.

Robey, R. W., K. K. To, O. Polgar, M. Dohse, P. Fetsch, M. Dean and S. E. Bates (2009). "ABCG2: a perspective." Adv Drug Deliv Rev **61**(1): 3-13.

Rocchi, E., A. Khodjakov, E. L. Volk, C. H. Yang, T. Litman, S. E. Bates and E. Schneider (2000). "The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane." Biochem Biophys Res Commun **271**(1): 42-46.

Rodbell, M. (1966). "The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin." J Biol Chem **241**(17): 3909-3917.

Rodriguez, L. V., Z. Alfonso, R. Zhang, J. Leung, B. Wu and L. J. Ignarro (2006). "Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(32): 12167-12172.

Rubinstein, P. (1993). "Placental blood-derived hematopoietic stem cells for unrelated bone marrow reconstitution." J Hematother **2**(2): 207-210.

Safford, K. M., K. C. Hicok, S. D. Safford, Y. D. Halvorsen, W. O. Wilkison, J. M. Gimble and H. E. Rice (2002). "Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells." Biochem Biophys Res Commun **294**(2): 371-379.

Safford, K. M., S. D. Safford, J. M. Gimble, A. K. Shetty and H. E. Rice (2004). "Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells." Exp Neurol **187**(2): 319-328.

Salgarello, M., G. Visconti and E. Farallo (2010). "Autologous fat graft in radiated tissue prior to alloplastic reconstruction of the breast: report of two cases." Aesthetic Plast Surg **34**(1): 5-10.

Sampaolesi, M., Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D'Antona, M. A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin, M. G. De Angelis, K. P. Campbell, R. Bottinelli and G. Cossu (2003). "Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts." Science **301**(5632): 487-492.

Sato, S., T. Yoshimizu, E. Sato and Y. Matsui (2003). "Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ-cell development." Mol Reprod Dev **65**(1): 41-50.

Schaffler, A. and C. Buchler (2007). "Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies." Stem Cells **25**(4): 818-827.

Schenke-Layland, K., B. M. Strem, M. C. Jordan, M. T. Deemedio, M. H. Hedrick, K. P. Roos, J. K. Fraser and W. R. Maclellan (2009). "Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction." J Surg Res **153**(2): 217-223.

Schinkel, A. H. and J. W. Jonker (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 3-29.

Schwartz, S. D., C. D. Regillo, B. L. Lam, D. Elliott, P. J. Rosenfeld, N. Z. Gregori, J. P. Hubschman, J. L. Davis, G. Heilwell, M. Spirn, J. Maguire, R. Gay, J. Bateman, R. M. Ostrick, D. Morris, M. Vincent, E. Anglade, L. V. Del Priore and R. Lanza (2015). "Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies." Lancet **385**(9967): 509-516.

Selvaggi, T. A., R. E. Walker and T. A. Fleisher (1997). "Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions." Blood **89**(3): 776-779.

Shahdadfar, A., K. Fronsdal, T. Haug, F. P. Reinholt and J. E. Brinckmann (2005). "In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability." Stem Cells **23**(9): 1357-1366.

Shamblott, M. J., J. Axelman, J. W. Littlefield, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins, Y. Cui, L. Cheng and J. D. Gearhart (2001). "Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 113-118.

Shamblott, M. J., J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins and J. D. Gearhart (1998). "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13726-13731.

Simon, C., C. Escobedo, D. Valbuena, O. Genbacev, A. Galan, A. Krtolica, A. Asensi, E. Sanchez, J. Esplugues, S. Fisher and A. Pellicer (2005). "First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions." Fertil Steril **83**(1): 246-249.

Smith, A. G. (2001). "Embryo-derived stem cells: of mice and men." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 435-462.

Somorjai, I. M., J. U. Lohmann, T. W. Holstein and Z. Zhao (2012). "Stem cells: a view from the roots." Biotechnol J **7**(6): 704-722.

Spees, J. L., C. A. Gregory, H. Singh, H. A. Tucker, A. Peister, P. J. Lynch, S. C. Hsu, J. Smith and D. J. Prockop (2004). "Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy." Mol Ther **9**(5): 747-756.

Stevens, L. C. (1984). "Spontaneous and experimentally induced testicular teratomas in mice." Cell Differ **15**(2-4): 69-74.

Stewart, C. L., I. Gadi and H. Bhatt (1994). "Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line." Dev Biol **161**(2): 626-628.

Strelchenko, N., O. Verlinsky, V. Kukhareenko and Y. Verlinsky (2004). "Morula-derived human embryonic stem cells." Reprod Biomed Online **9**(6): 623-629.

Strem, B. M. and M. H. Hedrick (2005). "The growing importance of fat in regenerative medicine." Trends Biotechnol **23**(2): 64-66.

Stute, N., K. Holtz, M. Bubenheim, C. Lange, F. Blake and A. R. Zander (2004). "Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use." Exp Hematol **32**(12): 1212-1225.

Sugii, S., Y. Kida, W. T. Berggren and R. M. Evans (2011). "Feeder-dependent and feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells." Nat Protoc **6**(3): 346-358.

Summer, R., D. N. Kotton, X. Sun, B. Ma, K. Fitzsimmons and A. Fine (2003). "Side population cells and Bcrp1 expression in lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(1): L97-104.

Sundin, M., O. Ringden, B. Sundberg, S. Nava, C. Gotherstrom and K. Le Blanc (2007). "No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients." Haematologica **92**(9): 1208-1215.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

Talens-Visconti, R., A. Bonora, R. Jover, V. Mirabet, F. Carbonell, J. V. Castell and M. J. Gomez-Lechon (2007). "Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage." Toxicol In Vitro **21**(2): 324-329.

Taura, D., M. Noguchi, M. Sone, K. Hosoda, E. Mori, Y. Okada, K. Takahashi, K. Homma, N. Oyamada, M. Inuzuka, T. Sonoyama, K. Ebihara, N. Tamura, H. Itoh, H. Suemori, N. Nakatsuji, H. Okano, S. Yamanaka and K. Nakao (2009). "Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells." FEBS Lett **583**(6): 1029-1033.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.

Tian, X. L. and Y. Li (2014). "Endothelial Cell Senescence and Age-Related Vascular Diseases." J Genet Genomics **41**(9): 485-495.

Timper, K., D. Seboek, M. Eberhardt, P. Linscheid, M. Christ-Crain, U. Keller, B. Muller and H. Zulewski (2006). "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells." Biochem Biophys Res Commun **341**(4): 1135-1140.

Toma, J. G., M. Akhavan, K. J. Fernandes, F. Barnabe-Heider, A. Sadikot, D. R. Kaplan and F. D. Miller (2001). "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin." Nat Cell Biol **3**(9): 778-784.

Trubiani, O., S. F. Zalzal, R. Paganelli, M. Marchisio, R. Giancola, J. Pizzicannella, H. J. Buhning, M. Piattelli, S. Caputi and A. Nanci (2010). "Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells." J Cell Physiol **225**(1): 123-131.

Turner, M. L., K. McIlwaine, R. S. Anthony and A. C. Parker (1995). "Differential expression of cell adhesion molecules by human hematopoietic progenitor cells from bone marrow and mobilized adult peripheral blood." Stem Cells **13**(3): 311-316.

van Herwaarden, A. E. and A. H. Schinkel (2006). "The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins." Trends Pharmacol Sci **27**(1): 10-16.

van Herwaarden, A. E., E. Wagenaar, G. Merino, J. W. Jonker, H. Rosing, J. H. Beijnen and A. H. Schinkel (2007). "Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk." Mol Cell Biol **27**(4): 1247-1253.

Virtanen, K. A., M. E. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. J. Savisto, S. Enerback and P. Nuutila (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults." N Engl J Med **360**(15): 1518-1525.

Vlaming, M. L., J. S. Lagas and A. H. Schinkel (2009). "Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice." Adv Drug Deliv Rev **61**(1): 14-25.

Wakao, S., H. Akashi, Y. Kushida and M. Dezawa (2014). "Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues." Pathol Int **64**(1): 1-9.

Wakao, S., M. Kitada, Y. Kuroda, T. Shigemoto, D. Matsuse, H. Akashi, Y. Tanimura, K. Tsuchiyama, T. Kikuchi, M. Goda, T. Nakahata, Y. Fujiyoshi and M. Dezawa (2011). "Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(24): 9875-9880.

Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." Cell **100**(1): 157-168.

Wolbank, S., A. Peterbauer, M. Fahrner, S. Hennerbichler, M. van Griensven, G. Stadler, H. Redl and C. Gabriel (2007). "Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue." Tissue Eng **13**(6): 1173-1183.

Xu, X., Y. Liu, Z. Cui, Y. Wei and L. Zhang (2012). "Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation." J Biotechnol **162**(2-3): 224-231.

Xue, S., H. T. Zhang, P. Zhang, J. Luo, Z. Z. Chen, X. D. Jang and R. X. Xu "Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury." Neurosci Lett **473**(3): 186-191.

Xue, S., H. T. Zhang, P. Zhang, J. Luo, Z. Z. Chen, X. D. Jang and R. X. Xu (2010). "Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury." Neurosci Lett **473**(3): 186-191.

Yamanaka, S. (2009). "A fresh look at iPS cells." Cell **137**(1): 13-17.

Yamasaki, S., H. Mera, M. Itokazu, Y. Hashimoto and S. Wakitani (2014). "Cartilage Repair With Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation: Review of Preclinical and Clinical Studies." Cartilage **5**(4): 196-202.

Yanez, R., M. L. Lamana, J. Garcia-Castro, I. Colmenero, M. Ramirez and J. A. Bueren (2006). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease." Stem Cells **24**(11): 2582-2591.

Yanez, R., A. Oviedo, M. Aldea, J. A. Bueren and M. L. Lamana (2010). "Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells." Exp Cell Res **316**(19): 3109-3123.

Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-1920.

Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapietro, J. Sampath, J. J. Morris, I. Lagutina, G. C. Grosveld, M. Osawa, H. Nakauchi and B. P. Sorrentino (2001). "The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype." Nat Med **7**(9): 1028-1034.

Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-4295.

Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-228.