



# **“PLASTICIDAD DIFERENCIAL DE DISTINTOS CLONES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE LIPOASPIRADOS HUMANOS”**

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctora en Biología.

Presentada por:

María Isabel Arribas García de León

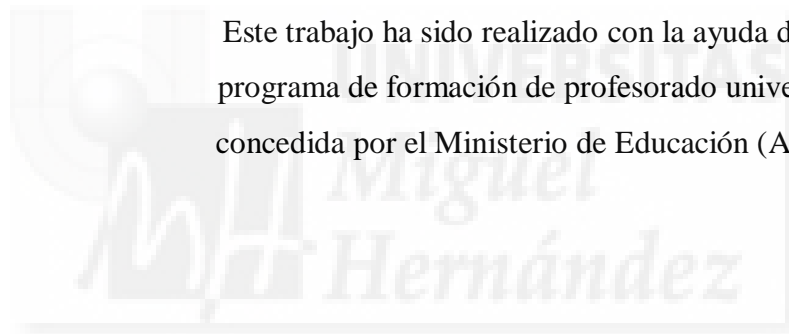
Licenciada en Biología

Directores de Tesis:

Enrique Roche Collado

Alfredo Santana Rodríguez

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de una beca del programa de formación de profesorado universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación (AP2006-00164)



Durante el periodo de realización de la presente tesis han tenido lugar las siguientes publicaciones y aportaciones a congresos:

#### **ARTÍCULOS:**

Phenotypic differences during the osteogenic differentiation of single-cell derived clones isolated from human lipoaspirates. Paredes, B., Santana, A., **Arribas, M. I.**, Vicente-Salar, N., De Aza, P. N., Roche, E., Such, J., Reig, J. A. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2010; 8.

#### **REVISIONES:**

Reprogramming adipose tissue derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. **Arribas, M. I.** *Avances en Diabetología*, 2008; 24: 21-26.

Insulin-producing cells derived from stem cells: recent progress and future directions. Santana, A., Ensenat-Waser, R., **Arribas, M. I.**, Reig, J. A., Roche, E. *J. Cell. Mol. Med.*, 2006; 10: 866-883.

Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells. Roche, E., Jones, J., **Arribas, M. I.**, León-Quinto, T., Soria, B. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006; 14: 6466-6474.

#### **CAPÍTULOS DE LIBRO:**

Strategies toward beta-cell replacement. Roche, E., Vicente-Salar, N., **Arribas, M. I.**, Paredes, B. Trends in stem cell biology and technology, *Humana Press*, 2009: 300-317.

Cell differentiation: Therapeutical challenges in diabetes. Roche, E., Vicente-Salar, N., **Arribas, M. I.**, Paredes, B. Progress in stem cell application, *Nova Science Publishers Inc.*, 2008: 209-233.

## CONGRESOS:

XXI Congreso nacional de la Sociedad Española de Diabetes. Barcelona, España, 2010. Póster: Caracterización de células productoras de preproglucagón obtenidas mediante protocolos de diferenciación de ESC hacia endodermo pancreático. Roche, E., Vicente-Salar, N., **Arribas, M. I.**, Santana, A., Pico, P. J., Fuster, E., Reig, J. A.

FEBS/EMBO-Workshop, Programming pancreatic beta-cells. El Perelló, Tarragona, España, 2006. Póster: Processing embryonic stem cells to obtain insulin-producing cells. Vicente-Salar, N., Santana, A., **Arribas, M. I.**, Paredes, B., Fuster, E., Roche, E., Reig, J. A.

XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Elche, España, 2006. Póster: Optimización de la obtención de endodermo definitivo mediante diferenciación dirigida de células madre embrionarias de ratón. Vicente-Salar, N., Santana, A., Paredes, B., **Arribas, M. I.**, Fuster, E., Roche, E., Reig, J. A.

XVIII Congreso de la SED. Madrid, España, 2006. Comunicación oral: Obtención de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón comprometidas a endodermo. Roche, E., Vicente-Salar, N., Paredes, B., **Arribas, M. I.**, Reig, J. A.

XVII Congreso Svedyn. Orihuela, Alicante, España, 2005. Póster: Diferenciación espontánea y dirigida in vitro de células embrionarias de ratón. Roche, E., **Arribas, M. I.**, Vicente-Salar, N., Santana, A., Paredes, B., Reig, J. A.

XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Zaragoza, España, 2005. Póster: Diferenciación espontánea y dirigida de células embrionarias de ratón en cultivos in vitro. Vicente-Salar, N., Santana, A., Paredes, B., **Arribas, M. I.**, Fuster, E., Roche, E., Reig, J. A.

**AYUDAS Y/O PREMIOS:**

Ayuda Merck Serono de investigación 2010 en el área de investigación clínica en endocrinología de la Fundación Salud 2000, por el proyecto: “Análisis de la plasticidad de células mesenquimales humanas aisladas de lipoaspirados. Evaluación de su potencial en terapia celular”.



Durante estos años son muchas las personas que han pasado por el Instituto de Bioingeniería y concretamente por mi laboratorio, que han participado en mayor o menor medida en este trabajo y a quienes me gustaría expresar mi gratitud por su apoyo.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Enrique Roche, la confianza que depositó en mí desde el primer momento y su esfuerzo porque continuara cuando más difíciles estaban las cosas. También quiero darle las gracias a mi codirector, Alfredo Santana, por permitirme ser su “efeba” y enseñarme los entresijos de la ciencia.

Por supuesto, no me puedo olvidar de Juan Antonio Reig, por consertirme continuar con el trabajo que Beatriz inició, a la cual estoy sinceramente agradecida por prestarme a sus pequeñines 1.7, 1.10 y compañía (te prometo que los he cuidado bien, hasta les he dado hermanos!!).

Gracias a mis compañeros y amigos Néstor, Encarna, Lucrecia y David, con quienes he compartido muchas horas dentro y fuera de este laboratorio. Gracias por estar ahí. También a Vanesa, Álex y Noelia, la nueva generación, espero que todo os vaya bien (empezando porque os concedan la tan ansiada beca). A Lupe, por el tiempo que pasó aquí y a la que debemos una visita a Cáceres.

A Ana Belén, Pascual y Jose Miguel por su ayuda en los últimos experimentos.

Gracias a todos los que durante estos años de trabajo en este Instituto he ido conociendo: África, Luis, Marta, Laura, Ernesto, Álex, Sergi, Pablo, Paloma, Mariana, Carmen, Ana, Sonia, Ilida, Rocío, etc.

También quiero agradecer a mis amigas Verónica y Esther, por acompañarme en los buenos y no tan buenos momentos que estos años de amistad nos han brindado. Me hubiera gustado estar más cerca de vosotras, volver pronto a la península!!

Finalmente, todo esto no hubiera podido ser posible sin el apoyo incondicional de mi familia, especialmente de mis padres, mi hermano y mi marido. Esta tesis es también vuestro premio.

Gracias a todos.



*ÍNDICE*

<b>ABREVIATURAS.</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>16</b>
<b><i>I. Las células madre.</i></b>	<b>17</b>
1. Concepto y definición.	17
2. Clasificación.	18
2.1. Clasificación según su potencial de diferenciación.	18
2.2. Clasificación según su origen.	19
3. Concepto de nicho celular.	22
4. Terapia celular con células madre.	24
4.1. Terapia celular con células madre embrionarias.	25
4.2. Terapia celular con células madre adultas.	26
<b><i>II. Las células madre mesenquimales.</i></b>	<b>28</b>
1. Concepto y definición.	28
2. Aislamiento y cultivo.	29
3. Caracterización.	31
4. Potencial de diferenciación.	33
5. Fuentes de células madre mesenquimales.	34
<b><i>III. Las células madre de tejido adiposo.</i></b>	<b>35</b>
1. Aislamiento de células madre derivadas de tejido adiposo.	35
2. Caracterización.	36
3. Capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> .	37
4. Capacidad de regeneración tisular <i>in vivo</i> .	39
5. Ensayos clínicos actuales.	39
<b><i>IV. Inmunomodulación mediada por células madre mesenquimales.</i></b>	<b>41</b>
1. Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales.	41
2. La interacción entre MSC y linfocitos T.	42
3. Modulación de las células dendríticas.	43
4. Efectos de las MSC en linfocitos B.	43
5. Interacción entre MSC y células NK.	44
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>46</b>
I. Objetivo general.	47
II. Objetivos específicos.	47



<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>48</b>
<b><i>I. Técnicas de Cultivo Celular.</i></b>	<b>49</b>
1. Líneas celulares.	49
2. Obtención de células madre de tejido adiposo.	49
3. Selección clonal de células madre de tejido adiposo.	50
4. Medios de cultivo.	51
5. Descongelación de células.	51
6. Mantenimiento del cultivo y tripsinización.	52
7. Contaje y viabilidad celular.	53
8. Congelación de células.	54
9. Protocolos de diferenciación.	55
9.1. Protocolos de diferenciación a linaje mesodérmico.	55
9.2. Protocolo de diferenciación a linaje ectodérmico.	56
10. Microscopía.	57
<b><i>II. Técnicas de Biología Molecular.</i></b>	<b>58</b>
1. Extracción de ARN total.	58
2. Medida de la concentración de ARN total.	60
3. Retrotranscripción de los ARNs mensajeros.	60
4. Diseño de cebadores para RT-PCR.	61
5. RT-PCR convencional.	63
6. RT-PCR a tiempo real.	64
<b><i>III. Tinciones Celulares.</i></b>	<b>65</b>
1. Tinción con alizarina.	65
2. Tinción con oil red.	66
<b><i>IV. Inmunofluorescencia.</i></b>	<b>68</b>
1. Inmunofluorescencia de colágeno tipo I.	68
2. Inmunofluorescencia de marcadores neuronales.	69
<b><i>V. Registro Intracelular de Calcio</i></b>	<b>71</b>
<b><i>VI. Secreción de Citocinas.</i></b>	<b>72</b>
1. Cuantificación de citocinas Th1/Th2.	73
2. Cuantificación de citocinas inflamatorias.	75
<b><i>VII. Análisis estadístico.</i></b>	<b>78</b>

---

<b>RESULTADOS.</b>	<b>79</b>
1. Aislamiento de células madre de tejido adiposo y selección clonal.	80
2. Caracterización génica de poblaciones clonales de células madre de tejido adiposo.	82
3. Análisis del potencial de diferenciación hacia distintos tipos celulares de poblaciones clonales de células madre de tejido adiposo.	83
3.1. Diferenciación osteogénica.	83
3.2. Diferenciación adipogénica.	93
3.3. Diferenciación neuronal.	96
4. Cuantificación de citocinas secretadas por poblaciones clonales de h_ASC.	101
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>106</b>
1. La selección clonal en células madre de tejido adiposo permite obtener poblaciones con distinta plasticidad.	107
2. Poblaciones clonales de h_ASC poseen diferentes potenciales de diferenciación hacia linaje osteogénico.	110
3. Clones aislados de células madre de tejido adiposo presentan distinta capacidad de diferenciación a linaje adipogénico.	113
4. Clones de h_ASC adquieren morfología neuronal al ser inducidos hacia linaje neurogénico.	115
5. Los clones aislados de h_ASC presentan heterogeneidad en la secreción de citocinas.	119
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>126</b>



*ABREVIATURAS*

AC	Anticuerpo	FFA-BSA	BSA sin ácidos grasos
ADN	Ácido desoxirribonucleico	FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
ADSC	Célula madre derivada de tejido adiposo	FITC	Fluoresceína isotiocianato
ALCAM	Molécula de adhesión celular activadora de leucocitos	Flt-3	FMS-like tirosina kinasa 3
ALP	Fosfatasa alcalina	GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
aP2	Proteína de adipocitos 2	GM-CSF	Factor estimulador colonias granulocitos macrófagos
APC	Células presentadoras de antígenos	GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía
ARN	Ácido ribonucleico	GPDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	h_ASC	Célula madre mesenquimal tejido adiposo humano
ASC	Célula madre mesenquimal de tejido adiposo	HGF	Factor de crecimiento hepático
ASMA	Actina de músculo liso alfa	HLA	Antígeno leucocitario humano
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos	IBMX	Isobutylmetilxantina
BHA	Hidroxibutilanisol	ICAM	Molécula de adhesión intercelular
BME	Beta mercaptoetanol	IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
BMP2	Proteína morfogenética de hueso 2	IFN $\gamma$	Interferón gamma
BMSC	Célula madre mesenquimal de médula ósea	Ig	Inmunoglobulina
BSA	Albúmina sérica bovina	IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
BST-1	Antígeno de células del estroma de médula ósea 1	IL	Interleuquina
BSP	Sialoproteína de hueso	LIF	Factor inhibidor de la leucemia
CBA	Cytometric Bead Array	LFA-3	Antígeno de linfocito asociado a la función 3
CD	Conjunto (cluster) de diferenciación	LPL	Lipoproteína lipasa
CFU-F	Unidad formadora de colonias de fibroblastos	LPS	Lipopolisacárido
DC	Célula dendrítica	NCAM	Molécula de adhesión celular neural
DEPC	Dietil pirocarbonato	MAP-2	Proteína asociada a microtúbulos 2
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco	MCAM	Molécula de adhesión celular de melanoma
DMSO	Dimetilsulfóxido	MCI	Masa celular interna
dNTP	Desoxirribonucleótido fosfato	M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
DTT	Ditiotreitol	MHC	Complejo mayor histocompatibilidad
ECC	Célula madre de carcinoma embrionario	MPC	Célula progenitora mesenquimal
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético	MSC	Célula madre mesenquimal
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	MSF	Fibroblastos estromales de médula
EGC	Célula madre germinal	Nb	Neuroblastoma
ENS	Enolasa neuroespecífica	NeuN	Núcleo neuronal
ESC	Célula madre embrionaria	NF-H	Neurofilamento pesado
FBS	Suero fetal bovino	NF-M	Neurofilamento intermedio

NK	Célula asesina natural	VEGF	Factor de crecimiento endotelio-vascular
OD	Densidad óptica		
OSM	Oncostatina M		
OST	Osteoblastos		
PBS	Tampón fosfato salino		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
PE	Ficoeritrina		
PFA	Paraformaldehido		
PGE2	Prostaglandina E 2		
PLA	Procesado de lipoaspirado		
PMA	Acetato de forbol miristato		
PPAR $\gamma$	Receptor $\gamma$ activado por proliferadores peroxisomales		
rbFGF	Receptor factor de crecimiento de fibroblastos básico		
rEGF	Receptor del factor de crecimiento epidérmico		
rG-CSF	Receptor factor estimulante colonias de granulocitos		
rIFN $\gamma$	Receptor del interferón gamma		
rIL	Receptor de interleuquina		
rLIF	Receptor del factor inhibidor de la leucemia		
rPDGF	Receptor factor crecimiento derivado de plaquetas		
rSCF	Receptor del factor de células madre		
rTF	Receptor de la transferrina		
rTGF $\beta$	Receptor del factor de crecimiento transformante beta		
rTNF	Receptor del factor de necrosis tumoral		
SCF	Factor de células madre		
SVF	Fracción vásculo-estromal		
Ta	Temperatura de annealing o hibridación		
TBE	Tris borato EDTA		
TE	Tris EDTA		
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta		
Thy-1	Antígeno de diferenciación de timocitos 1		
Tm	Temperatura de fusión		
TNE	Tris NaCl EDTA		
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa		
Treg	Linfocitos T reguladores		
TSC	Célula madre de trofoblasto		
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular		



*INTRODUCCIÓN*

## I. LAS CÉLULAS MADRE.

### 1. Concepto y definición.

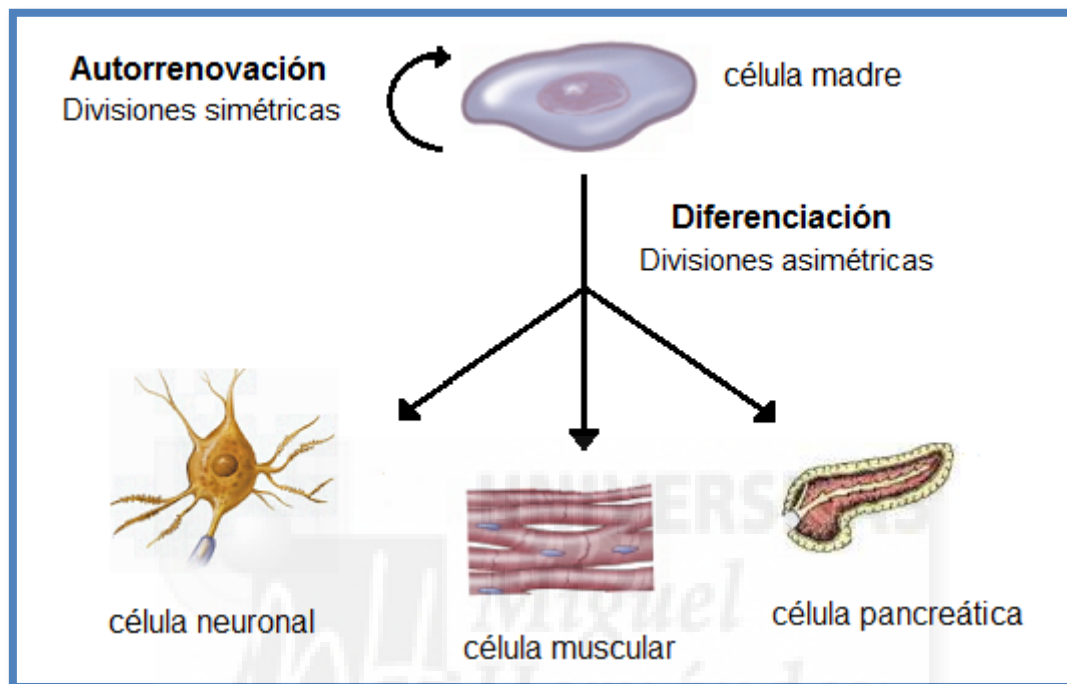
Las células madre o también conocidas como células troncales, están siendo en las últimas décadas objeto de un intenso y creciente interés debido a sus características y a su potencial terapéutico. La investigación con células madre está proporcionando conocimientos acerca de cómo un organismo se desarrolla a partir de una sola célula fertilizada, así como sobre los mecanismos mediante los cuales los individuos adultos sanos reparan las células dañadas y mantienen la homeostasis de sus órganos y tejidos. Además, cada vez se están estableciendo nuevas conexiones entre el comportamiento de las células madre y las células cancerosas, lo que hace del estudio de éstas una buena manera de aproximarse al conocimiento y tratamiento del cáncer. Así pues, en el área de la investigación en biomedicina, las células madre están siendo cada vez más utilizadas como fuente de terapia celular para el tratamiento de ciertas enfermedades, como Parkinson, Alzheimer, diabetes, enfermedades cardíacas, etc.

Las células madre se suelen definir por una serie de propiedades que las hacen distintas al resto de células y les confieren las características óptimas para su uso en medicina regenerativa. Entre ellas, dos son las más relevantes:

- 1) Alta tasa de proliferación y regeneración clonal mediante divisiones simétricas (autorrenovación).
- 2) Alto grado de potencialidad para diferenciarse en distintos tipos celulares a través de divisiones asimétricas (diferenciación).

Por tanto, las células madre se pueden definir como células con capacidad de división simétrica y asimétrica que las hacen capaces de dividirse de forma continua y casi ilimitada, además de poder diferenciarse a diferentes estirpes celulares (Esquema 1). Frecuentemente se suelen adscribir a las células madre otras propiedades como son la capacidad de mantenerse en un estado indiferenciado durante su cultivo *in vitro* y la de poder mantenerse *in vivo* en un estado de reposo quiescente sin dividirse (Hall y Watt, 1989; Potten y Loeffler, 1990). Las células madre se han clasificado hasta la fecha en función de su grado de potencialidad a la hora de generar distintos tipos celulares así como por su origen. En cualquier caso, estas características no explican totalmente la

naturaleza de todos los tipos de células madre descritos, por lo que sigue siendo necesaria una investigación más profunda en este campo para delimitar unas definiciones más precisas y acordes con la biología de estas células.



Esquema 1. Esquema de las dos propiedades más importantes que definen a las células madre.

## 2. Clasificación.

Las células madre se pueden clasificar atendiendo a su grado de potencialidad a la hora de diferenciarse en los distintos tipos celulares o también según su origen.

### 2.1. Clasificación según su potencial de diferenciación.

En función de la capacidad de diferenciarse hacia los distintos tipos celulares, las células madre se pueden clasificar en:



- a) Totipotenciales: pertenecen a este grupo las células madre capaces de diferenciarse hacia cualquier tipo celular, incluyendo el trofoblasto que dará lugar a la placenta, los tejidos extraembrionarios y el cordón umbilical. Este tipo de células solo están presentes en el embrión en los primeros estadios de división (hasta la etapa de 8-16 células). Este concepto de célula madre totipotente no es del todo correcto, ya que no pueden dividirse ilimitadamente, pues antes de llegar al estado de blastocisto ya se han comprometido, limitando su plasticidad.
- b) Pluripotenciales: son aquellas que pueden dar lugar a los distintos tipos celulares del embrión, es decir, todos los tipos celulares que proceden de las tres capas embrionarias y la línea germinal. Pertenecen a este grupo las células madre embrionarias aisladas de la masa celular interna del blastocisto.
- c) Multipotenciales: son células más comprometidas que pueden derivar a los distintos tipos de células que se encuentran en un órgano o tejido determinado.
- d) Unipotenciales: son células muy comprometidas y con un grado de diferenciación muy limitado, ya que se diferencian hacia un único tipo celular.

## 2.2. Clasificación según su origen.

Dependiendo de su origen, las células madre se pueden clasificar en:

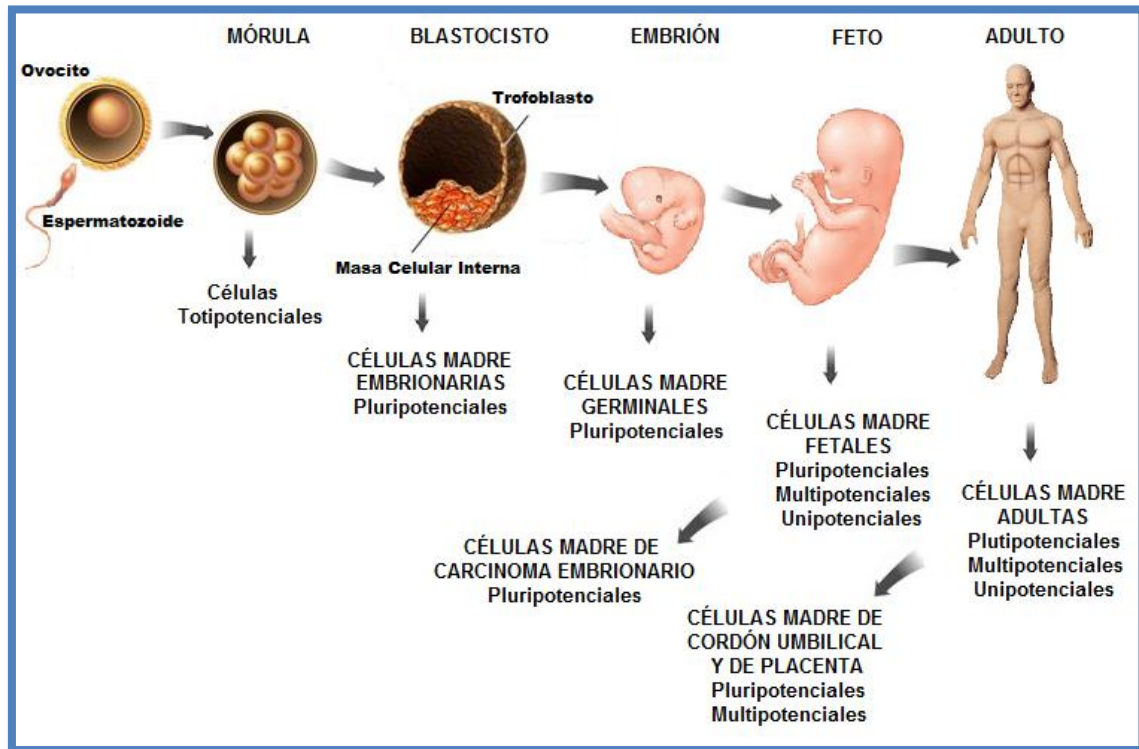
- a) Células madre embrionarias (ESC): proceden de embriones antes de su implantación en el útero, según la especie se tratará de embriones de menos de tres días (ratón) o de menos de siete días (humano). El embrión en este estadio se denomina blastocisto, tiene aproximadamente 100 células y en él se diferencian dos grupos celulares, las que se encuentran en su interior

conocidas como células de la masa celular interna (MCI) y las que se encuentran en el exterior y que forman el trofoblasto. Las células aisladas de la MCI y cultivadas *in vitro* son las ESC. Así pues, son células pluripotentes capaces de diferenciarse en todos los tejidos derivados de las tres capas embrionarias, pero no dan lugar a la placenta. Además, también se caracterizan por mantener un cariotipo estable a lo largo de las sucesivas divisiones, pueden dar lugar a teratocarcinomas cuando se trasplantan en un individuo adulto y cuando se trasplantan en embriones en desarrollo pueden colonizar los tejidos fetales e incluso la línea germinal. Las primeras líneas de células madre se aislaron en ratón a principio de los años 80 (Evans y Kaufman, 1981; Axelrod, 1984) y entre los años 1998 y 2000 se obtuvieron las primeras ESC de origen humano (Thomson y col., 1998; Reubinoff y col., 2000).

- b) Células madre germinales (EGC): provienen de las células germinales primordiales precursoras de los gametos maduros. Las primeras líneas celulares fueron establecidas en ratón a principio de los años 90 (Matsui y col., 1992; Resnick y col., 1992) y en 1998 se aislaron las primeras EGC de origen humano (Shamblott y col., 1998). Las EGC de ratón son muy similares a las ESC de la misma especie en cuanto a sus marcadores, características y propiedades. Sin embargo, las EGC y ESC de origen humano se diferencian en su morfología, presencia de marcadores de superficie diferentes, no forman teratomas cuando se trasplantan y su capacidad de proliferación y división es limitada (Shamblott y col., 2001).
- c) Células madre de carcinoma embrionario (ECC): son células indiferenciadas que provienen de los teratocarcinomas de la línea germinal. Los teratocarcinomas se empezaron a estudiar en la década de los 50, pero hasta 1970 no se aislaron las primeras ECC de ratón (Kahn y Ephrussi, 1970). De estos estudios se concluyó que existían células con múltiple capacidad de diferenciación y con una capacidad de crecimiento ilimitado. Siete años después se aislaron las primeras ECC de teratocarcinomas humanos (Hogan y col., 1977). Son muy parecidas a las ESC, pero su

mayor diferencia es que tienen un cariotipo inestable, por lo que van acumulando mutaciones con las sucesivas divisiones.

- d) Células madre del trofoblasto (TSC): se han obtenido en ratón, a partir de la capa exterior de células denominada trofoblasto que rodea al blastocisto de tres días y medio. También se pueden obtener de tejido ectodérmico extraembrionario de embriones de seis días y medio o del ectodermo coriónico de embriones de siete días y medio. Todas estas líneas de TSC poseen características similares a pesar de proceder de distintos periodos del desarrollo embrionario. Para su cultivo necesitan heparina, un medio condicionado de fibroblastos embrionarios y el factor de crecimiento de fibroblastos cuatro (FGF-4) (Tanaka y col., 1998). Las TSC sólo se pueden diferenciar en células del linaje trofoblástico (corion y placenta), nunca en tejidos procedentes del embrión o cualquier otro tipo de tejido extraembrionario como amnios, saco vitelino y alantoides, que se forman a partir de la MCI.
- e) Células madre del cordón umbilical y de la placenta: son obtenidas en el momento del alumbramiento a partir de estos tejidos fetales que normalmente son desechados. Se cree que podrían representar un estado intermedio entre las células madre embrionarias y las adultas, ya que poseen marcadores de ambos tipos celulares (Ilancheran y col., 2009).
- f) Células madre adultas y/o fetales: son células que participan en la regeneración de los tejidos, reemplazando a aquellas que han sido dañadas por lesión o enfermedad. Sin embargo, uno de los problemas más importantes es el de identificar los distintos tipos posibles de células madre que existen en los tejidos adultos, así como su capacidad de diferenciación y de autorrenovación. Se cree que estas células se localizan en un entorno tisular que controla su proliferación y diferenciación denominado nicho (Moore y Lemischka, 2006).



Esquema 2. Distintos tipos de células madre según su origen y relación con su potencial de diferenciación.

### 3. Concepto de nicho celular.

El concepto de nicho celular comenzó a utilizarse a finales de los años 70, fruto de los estudios de Schofield en 1978, sobre cómo los diferentes microambientes hematopoyéticos inductores del bazo y médula ósea pueden influir en las vías de diferenciación de las células madre hematopoyéticas. Según esta teoría, las células madre se encuentran en un microambiente óptimo y controlado que permite un equilibrio entre el estado indiferenciado y/o quiescente y su proliferación y/o diferenciación. Se puede decir que el nicho define de forma precisa la forma de dividirse de la célula madre y el destino de las células hijas. Así pues, cuando una célula madre se divide sólo una célula hija permanecería en el nicho y la otra iniciaría su diferenciación fuera de él. El nicho constituye, por tanto, una unidad estructural donde las interacciones por contacto celular, los factores solubles y la matriz extracelular controlan la biología de las células madre para que se encuentren en sincronía con las necesidades particulares del organismo.

Según la clasificación anterior de tipos de células madre de acuerdo a su origen, podríamos también clasificar los nichos en dos grandes grupos:

- a) Nicho de las células madre embrionarias: se refiere a un nicho temporal, ya que sólo existe durante las primeras fases del desarrollo embrionario y conforme el embrión va madurando estas células adquieren un potencial de diferenciación más restringido.
  
- b) Nicho de las células madre adultas: hace referencia a microambientes tisulares concretos, donde las células madre son capaces de generar tipos celulares específicos para regenerar los órganos dañados y/o mantener la homeostasis tisular.

Un aspecto importante a tener en cuenta es que el cultivo *in vitro* de células madre conlleva un microambiente muy distinto a su hábitat natural. Las células se encuentran en un entorno muy diferente a su nicho natural, hecho que puede conducir a que existan notables diferencias entre las células *in vivo* y las cultivadas *in vitro*, ya que hay muchos factores que son simplificados para hacer su cultivo más sencillo y rutinario. Por ejemplo, se ha observado que las ESC en cultivo *in vitro* tienen una fuerte tendencia hacia linaje ectodérmico (Ying y col., 2003). Parece ser que al cultivar estas células fuera de su nicho, la ausencia de señales que recibe de él, hace que adquieran por defecto un compromiso hacia neuroectodermo. Otro aspecto derivado del control que ejerce el nicho sobre la proliferación de las células madre supone que la pérdida de este control conduciría a la obtención de células con una alta tasa de proliferación y baja diferenciación. Esta hipótesis de la existencia de un desequilibrio en la tasa de proliferación-diferenciación derivaría en la formación de células tumorales.

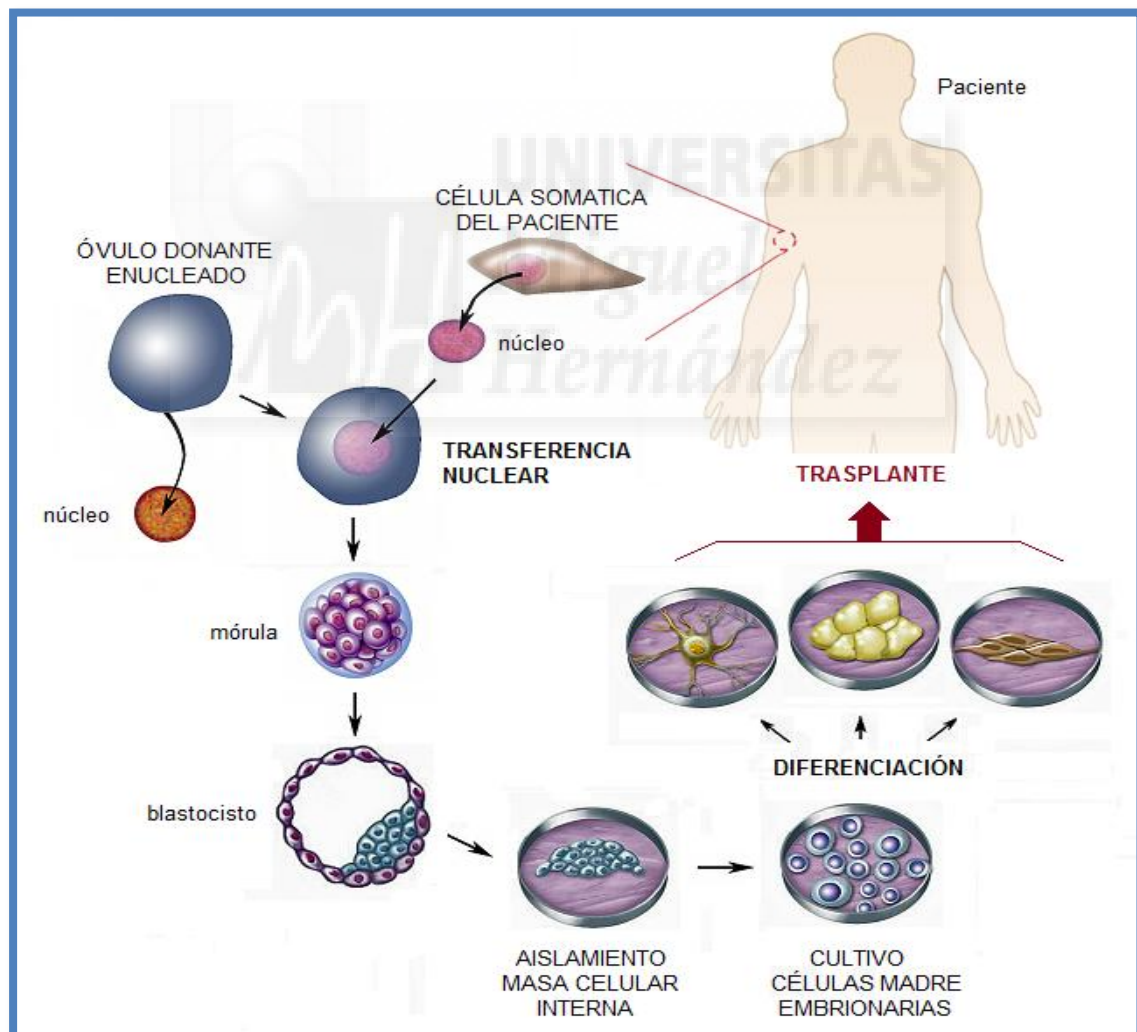
#### 4. Terapia celular con células madre.

La terapia celular tiene como objetivo la sustitución de un tejido o tipo celular enfermo o dañado por otro funcional. Actualmente la principal fuente de obtención de material biológico apropiado para estas sustituciones son los trasplantes de órganos y tejidos procedentes de donantes. Desafortunadamente, el número de órganos disponibles para trasplantes es siempre inferior al de personas que sufren algún desorden, esto implica la necesidad de buscar fuentes alternativas de producción de células y tejidos. Por este motivo, en las últimas décadas las células madre están siendo cada vez más utilizadas en este sentido, puesto que constituyen una buena fuente de obtención de material trasplantable, debido a la plasticidad que ofrecen a la hora de poder diferenciarse a un tipo celular o tejido concreto, sin tener que hacer uso de órganos completos. La principal ventaja terapéutica que presentan las células madre es la de poder emplearse en terapias celulares sin los problemas actuales ligados a los aloinjertos, como son la escasez de donantes histocompatibles y la necesidad de administrar drogas inmunosupresoras. Lo ideal, en este sentido, sería conseguir derivar un tejido con la identidad histológica del propio paciente para utilizarlo así como un autotrasplante.

Las células madre, ofrecen por tanto, enormes posibilidades en la terapia celular y podrían verse implicadas en numerosos usos clínicos, debido a sus propiedades de autorrenovación, proliferación y diferenciación, que hacen posible su crecimiento en placas de cultivo y la posibilidad de diferenciar a cualquier tipo celular. Esta posibilidad de diferenciarlas *in vitro* en una amplia variedad de tipos celulares haría posible la regeneración de órganos dañados, ofreciendo nuevos tratamientos a enfermedades tales como la diabetes, enfermedades del sistema nervioso (Alzheimer, Parkinson, esclerosis), enfermedades cardiovasculares, distrofia muscular, la sustitución de piel e injertos en quemados, etc.

#### 4.1. Terapia celular con células madre embrionarias.

Las células madre embrionarias, por su naturaleza pluripotente, son en teoría las que tienen un mayor interés terapéutico por su capacidad de dar lugar a cualquier tipo celular. Sin embargo, al igual que ocurre con el trasplante de órganos, la utilización de estas células en usos clínicos también tiene que enfrentarse al problema del rechazo inmunológico. Normalmente, esto ocurre porque las ESC suelen provenir de embriones congelados y por tanto no se trata de trasplantes autólogos. El uso de la tecnología basada en la transferencia nuclear permitiría crear células pluripotentes genéticamente idénticas al paciente, evitando así problemas de rechazo (Esquema 3), cosa que todavía no ha sido probada en humanos y además, probablemente, su realización sea imposible.



Esquema 3. Células de la masa celular interna de un blastocisto obtenido mediante técnicas de transferencia nuclear tienen el potencial de diferenciar *in vitro* en células con la misma carga genética del paciente, evitando así problemas de rechazo inmunitario.



Sin embargo, el uso de estas células trae consigo ciertos problemas éticos y legales a la hora de hacer uso de embriones humanos para investigación (Sánchez-Caro y Abellán, 2007), quedando todo esto normalizado en la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica (BOE núm.159, 4/07/2007, págs. 28826-28848). Además, el alto riesgo de formación de teratomas al ser trasplantadas es otro problema necesario de solucionar para poder llevar a cabo ensayos clínicos con estas células. A pesar de ello, recientemente (Octubre 2010) se ha autorizado en Estados Unidos el primer ensayo clínico con células madre embrionarias, eso sí, las células previamente a ser implantadas se diferencian *in vitro* hacia oligodendrocitos. El ensayo, que se encuentra en su fase inicial, servirá para evaluar la seguridad y posterior eficacia en el tratamiento de pacientes con daños medulares.

#### **4.2. Terapia celular con células madre adultas.**

Las células madre procedentes de tejidos adultos son otra fuente potencial de células autólogas en terapias de trasplante. La mayor ventaja del uso de este tipo celular es que pueden ser adquiridas del propio paciente y después de su expansión y cultivo pueden volver a trasplantarse sin riesgo de rechazo inmunitario. Además no hay restricciones éticas ni legales asociadas a su uso.

Hasta la actualidad se han identificado y aislado células madre adultas en diferentes tejidos tales como médula ósea, sangre, músculo esquelético, piel, tejido adiposo, cerebro, córnea, retina, tracto gastrointestinal, hígado y páncreas. Todas ellas, en principio, parecen tener un limitado potencial de desarrollo, siendo su capacidad de división algo más limitada que la de las células madre embrionarias, al igual que su capacidad de diferenciación, pudiendo originar solamente células de la capa embrionaria de la que deriva el órgano en cuestión. Sin embargo, en los últimos años han aparecido estudios que sugieren que estas células tienen una capacidad de crecimiento y diferenciación mayor de lo esperado, pudiendo originar células de otros tejidos con distinto origen embrionario (Anderson y col., 2001). En este sentido, se ha visto que hay ciertas células madre adultas con propiedades multipotentes, como las de médula ósea, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en células de otros órganos



o tejidos, como células de músculo esquelético, células hepáticas, neuronas o células productoras de insulina. Sin embargo, no está claro si esta plasticidad o potencial de transdiferenciación es una cualidad propia de las células madre adultas o es consecuencia de procesos de fusión celular (Terada y col., 2002; Ying y col., 2002).

A pesar de las ventajas que presenta el uso de células madre adultas frente a las de origen embrionario (Tabla 1), todavía existen múltiples cuestiones a resolver, por ejemplo, la identificación de las señales moleculares que inician su activación, la identificación de sus progenitores, la creación de protocolos de aislamiento y purificación más sencillos, la obtención de protocolos de diferenciación *in vitro* que consigan aumentar su plasticidad o la identificación de más tipos de células madre adultas.

Tabla 1. Diferencias en el uso de células madre embrionarias y células madre adultas.

<b>Células madre embrionarias</b>	<b>Células madre adultas</b>
Alta capacidad de expansión	Capacidad de expansión más limitada
Pluripotentes	Unipotentes y/o multipotentes
Necesidad de terapias inmunosupresoras	Altamente compatibles, trasplante autólogo
Alto riesgo de teratocarcinomas	Bajo riesgo tumorigénico
Necesidad de embriones para su aislamiento	Aislamiento de individuos adultos
Objeciones éticas y legales	No hay objeciones éticas ni legales
Aplicaciones clínicas restringidas	Ensayos clínicos realizados

## II. LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.

### 1. Concepto y definición.

Como anteriormente se ha expuesto, de entre las distintas células madre de tejidos adultos, las células madre obtenidas de médula ósea son las que más interés reclaman, debido a su gran plasticidad, fácil obtención y cultivo, así como por su alto grado de crecimiento *in vitro*. En la médula ósea no solo están presentes las células madre hematopoyéticas, también se pueden encontrar otras células multipotentes en el estroma, llamadas células mesenquimales por su origen embrionario, ya que derivan de la lámina mesotelial del embrión. Estas células fueron por primera vez identificadas por Friedenstein y colaboradores en 1966, los cuales aislaron una población de células progenitoras de médula ósea de rata capaces de formar hueso. Posteriormente, en 1976 describieron esta población de células aisladas a partir de extractos de médula ósea como unas células que se adherían al plástico, podían ser cultivadas durante tiempo indefinido y tenían la capacidad de derivar a células de tejidos mesenquimales como hueso, cartílago, músculo, tendón, grasa y estroma medular.

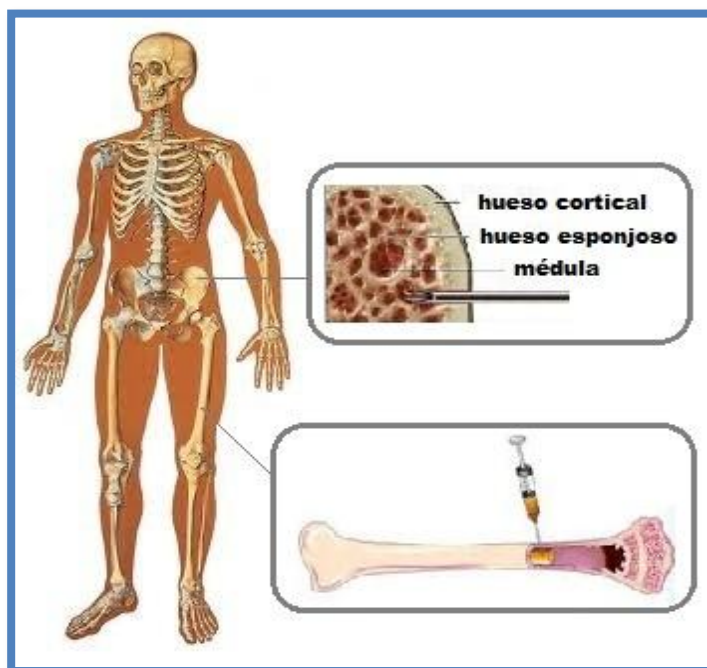
Esta población de células multipotentes de la médula ósea ha sido denominada desde su primera descripción con diferentes nombres. Las primeras referencias a estas células se hacían con las siglas CFU-F del inglés “colony forming unit-fibroblast” o MSF “marrow stromal fibroblast”. Estos términos han ido sustituyéndose gradualmente por otros actualmente aceptados como MSC “marrow stromal cells”, MSC “mesenchymal stem cells” o MPC “mesenchymal progenitor cells”. Aquí nos referiremos a ellas como células madre mesenquimales de médula ósea (BMSC “bone marrow mesenchymal stem cells”).

En resumen, las células madre mesenquimales son células multipotentes que pueden ser diferenciadas a células de linaje mesodérmico y, bajo las condiciones apropiadas, a linaje endodérmico y ectodérmico. Además de encontrarse en médula ósea también se pueden aislar de otros tejidos como tejido adiposo, hígado fetal, sangre, pulmón, placenta y cordón umbilical. Por otro lado, las BMSC son células capaces de escapar al reconocimiento inmunológico e inhibir respuestas inmunes. Todo esto hace

que sean una prometedora herramienta para la medicina regenerativa y la terapia celular.

## 2. Aislamiento y cultivo.

Las BMSC son generalmente aisladas de aspirados de médula ósea obtenidos de la parte superior de la cresta iliaca de la pelvis en humanos, pero alternativamente también se pueden obtener de los compartimentos medulares de la tibia y fémur (Esquema 4). Estos aspirados son posteriormente cultivados en placas y crecidos en un medio basal suplementado con lotes de suero fetal bovino (FBS) previamente seleccionados (Lennon y col., 1996). Esta población resultante de células con adherencia al plástico se considera el primer cultivo primario de BMSC *ex vivo* y suele constituir entre el 0,001 y el 0,01% del total de las células mononucleadas de la médula. Estas BMSC recién aisladas se mantienen en cultivo durante varios días sin tripsinizar, durante los cuales las células hematopoyéticas no adherentes van siendo eliminadas con los sucesivos cambios de medio. Vistas a través del microscopio, constituyen una población más o menos homogénea de células con una morfología fusiforme similar a la que presentan los fibroblastos.



Esquema 4. Zonas más frecuentes de aislamiento de BMSC.

Las BMSC pueden ser subcultivadas, manteniendo normales su cariotipo y actividad telomerasa. Sin embargo, si se cultivan durante periodos extensos se pueden observar signos de senescencia, lo cual puede afectar a la multipotencialidad de estas células y disminuir su capacidad de diferenciación (Digirolamo y col., 1999). Este fenómeno se conoce como senescencia replicativa, el cual suele ser común en cultivos de células diploides (Kassem y col., 1997) y puede ser causado por varios factores, incluyendo el acortamiento de los telómeros durante subcultivos continuados *in vitro* o la ausencia de actividad telomerasa. Además, existe cierta variabilidad en su capacidad de expansión, ya que mientras algunas preparaciones de BMSC pueden ser expandidas hasta 35-40 veces, otras cesan su crecimiento después de 5-10 pases (Bruder y col., 1997). Este hecho se puede deber a varios motivos, por ejemplo, el procedimiento usado para aislar y cultivar las células, la baja existencia de BMSC frente a las células hematopoyéticas en el aspirado de médula ósea utilizado o incluso por el donante (Phinney y col., 1999). Otro efecto que se ha observado durante el cultivo prolongado de estas células es la acumulación de alteraciones cromosómicas y la activación de oncogenes como c-myc (Rubio y col., 2005). Este hecho produce un efecto contrario al anteriormente citado, dando lugar a células inmortales con gran similitud a las cancerosas como consecuencia de esta transformación espontánea.

Como se ha dicho anteriormente, el aislamiento de las BMSC se basa en su adherencia a las superficies plásticas utilizadas para su cultivo. Debido a esto, el principal inconveniente derivado del propio método de aislamiento, es la heterogeneidad celular del cultivo inicial, ya que es difícil evitar contaminaciones con otros tipos celulares presentes en el aspirado y que también se adhieran al plástico. Esto supone una limitación para el posible uso clínico de estas poblaciones, ya que los resultados pueden tener una baja reproducibilidad. Por este motivo, hay investigadores que han intentado desarrollar diferentes sistemas para obtener poblaciones celulares homogéneas, muchos basados en el desarrollo de una serie de anticuerpos monoclonales frente a antígenos de superficie de BMSC. En 1991, Simmons y Torok-Storb, desarrollaron un anticuerpo monoclonal denominado Stro-1 capaz de reaccionar con células progenitoras no hematopoyéticas del estroma de la médula ósea para aislar poblaciones puras de células con características de BMSC. En 1992, Haynesworth y colaboradores, utilizaron el anticuerpo SH-2 frente BMSC humanas, el cual reacciona con un epitopo presente en el complejo del receptor del factor de crecimiento

transformante beta (TGF- $\beta$ ) conocido como CD105 o endoglina, que al igual que los anticuerpos SH-3 y SH-4 los cuales reconocen distintos epitopos de CD73, también conocido como 5'-nucleotidasa (Barry y col., 2001), no reaccionan con células hematopoyéticas o con osteocitos. En 1997, Bruder y colaboradores, utilizaron el anticuerpo SB-10 para caracterizar poblaciones de BMSC indiferenciadas. El antígeno específico de SB-10 se identificó como CD166, el cual juega un papel importante en la ruta de diferenciación osteogénica (Bruder y col., 1998).

Desafortunadamente, los antígenos identificados mediante procedimientos similares a los anteriormente descritos, se expresan en variedad de tipos celulares y no son únicamente específicos de BMSC. Este hecho dificulta su identificación y las hace poco diferenciables *in vivo* de otras poblaciones celulares, ya que por ejemplo comparten marcadores con linfocitos, células endoteliales, epiteliales y musculares.

### 3. Caracterización.

A pesar de los esfuerzos realizados para intentar caracterizar las poblaciones de BMSC a través de la identificación de marcadores de superficie específicos, todavía no existe un marcador o combinación de ellos que sirva para identificar inequívocamente a estas células. Así pues, las BMSC suelen ser caracterizadas tanto por la combinación de marcadores de superficie como por sus propiedades funcionales.

Las BMSC producen numerosos factores de crecimiento hematopoyéticos y no hematopoyéticos, así como diversas citocinas, receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión y moléculas de la matriz extracelular (Tabla 2). Dependiendo de los métodos de cultivo utilizados y el estado de diferenciación de las células, pueden ser expresadas distintas combinaciones de estas moléculas en las diferentes poblaciones de BMSC aisladas, lo que puede influir finalmente en la reproducibilidad de los experimentos. Por contra, es imprescindible para su caracterización que sean negativas en la expresión de los antígenos típicos hematopoyéticos CD45, CD34 y CD14 (Pittenger y col., 1999), así como que expresen el antígeno leucocitario humano (HLA) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y no el de clase II (Le Blanc, 2003).

Tabla 2. Marcadores fenotípicos presentes en células madre mesenquimales.

Tipo de marcador	Nombre	Conjunto (cluster) de Diferenciación	Referencias
Antígenos específicos	STRO-1		Simmons, 1991 Haynesworth, 1992 Galmiche, 1993
	SH2 (endoglina)	CD105	
	SH3, SH4	CD73	
	ASMA (MAB1470)		
Moléculas de la matriz extracelular	Colágeno tipo I,III,IV,V,VI		Chichester, 1993 Minguell, 2001
	Fibronectina		
	Laminina		
	Ácido hialurónico		
	Proteoglicanos		
Moléculas de adhesión y proteínas de membrana	Integrina $\alpha$ 1,2,3,5,6	CD49a,b,c,e,f	Pittenger, 1999 Conget, 1999 Majumdar, 2003 Deans, 2000
	Integrina $\alpha$ V	CD51	
	Integrina $\beta$ 1	CD29	
	Integrina $\beta$ 3	CD61	
	Integrina $\beta$ 4	CD104	
	ICAM-1	CD54	
	ICAM-2	CD102	
	ICAM-3	CD50	
	VCAM-1	CD106	
	ALCAM-1	CD166	
	MCAM/MUC18	CD146	
	NCAM	CD56	
	Tetraspan	CD9	
	LFA-3	CD58	
	L-selectina	CD621	
	Thy-1	CD90	
BST-1	CD157		
Receptor ácido hialurónico	CD44		
Receptores de factores de crecimiento	rTNF-I	CD120a	Pittenger, 1999 Deans, 2000 Minguell, 2001
	rTNF-II	CD120b	
	rIFN $\gamma$ -I	CD119	
	rTGF $\beta$ -I y II		
	rIL-1	CD121a,b	
	rIL-3	CD123	
	rIL-4 $\alpha$	CD124	
	rIL-6	CD126	
	rIL-7	CD127	
	rSCF (C-Kit)	CD117	
	rG-CSF	CD114	
	rTF	CD71	
	rLIF	CD118	
	rbFGF	CD331	
	rEGF		
rPDGF	CD140		

<b>Factores de crecimiento y citocinas</b>	LIF		Haynesworth, 1996 Majumdar, 1998 Deans, 2000
	SCF		
	G-CSF		
	M-CSF		
	Flt-3	CD135	
	IL 6,7,8,11,12,14,15		

#### 4. Potencial de diferenciación.

Diversos estudios han demostrado la multipotencialidad de las MSC derivadas de médula ósea humana, siendo capaces de diferenciarlas hacia células de tejidos mesenquimatosos tales como hueso (Cheng y col., 1994), cartílago (Johnstone y col., 1998), tejido adiposo (Pittenger y col., 1999), tendón (Young y col., 1998), músculo (Wakitani y col., 1995) y estroma (Prockop, 1997). Además, durante la última década, se ha observado que las BMSC pueden diferenciar también hacia distintos tipos celulares no mesodérmicos, pudiendo obtenerse *in vitro* células de linajes ectodérmicos, como células neuronales (Sánchez-Ramos y col., 2000; Woodbury y col., 2000) o tejidos de origen endodérmico como hepatocitos (Lee y col., 2004; Aurich y col., 2007) y células pancreáticas (Moriscot y col., 2005; Karnieli y col., 2007; Sun y col., 2007). Sin embargo, esta plasticidad de las células madre mesenquimales todavía está siendo investigada, ya que en algunos casos no se ha podido demostrar la funcionalidad de las células obtenidas.

La comprensión de los mecanismos moleculares que dirigen la diferenciación de estas células es la base para poder utilizarlas en la generación de células y tejidos para aplicaciones en terapia celular. El compromiso y la diferenciación de las BMSC hacia tipos celulares específicos es un proceso temporal y altamente controlado en el cual están involucrados numerosos factores de transcripción, citocinas, factores de crecimiento y moléculas de la matriz extracelular. En este sentido, los perfiles de expresión génica creados mediante la tecnología de microchips o micromatrices de ADN, pueden ser utilizados para identificar genes que regulan los procesos de diferenciación en BMSC (Menicanin y col., 2009).

## 5. Fuentes de células madre mesenquimales.

Además de la médula ósea, recientemente se han identificado otras fuentes de células madre con potencial mesenquimal, es decir, capaces de diferenciar a osteocitos, condrocitos y adipocitos, como son el cordón umbilical (Lee y col., 2004), tejidos fetales (Campagnoli y col., 2001), líquido amniótico (Tsai y col., 2004), membrana sinovial (De Bari y col., 2001), pulpa dental (Miura y col., 2003), tejido adiposo (Zuk y col., 2001) y un largo etcétera.

A pesar de su diverso origen, todas estas células muestran escasas diferencias en cuanto a morfología, capacidad de adherencia a superficies plásticas, cinéticas de crecimiento, senescencia celular y/o capacidad de diferenciación. Este hecho unido a la inexistencia de un marcador específico que identifique cada población celular, hace que se las considere también células madre mesenquimales y que la utilización de unas u otras en aplicaciones terapéuticas dependa de la disponibilidad o accesibilidad a los tejidos donantes y de la facilidad de expansión *in vitro*. En este sentido, las células madre obtenidas a partir del tejido adiposo (ASC “adipose-derived stem cells”) constituyen una fuente alternativa a las células madre de médula ósea bastante atractiva, ya que se pueden aislar a partir de lipoaspirados humanos en mayor cantidad y de forma menos traumática para el paciente (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre BMSC y ASC como fuente de células para terapia celular humana.

	BMSC	ASC
<b>Cantidad tejido donante</b>	Menos abundante	Más abundante
<b>Accesibilidad</b>	Poco accesible (dentro hueso)	Muy accesible (subcutáneo)
<b>Técnica de extracción</b>	Cirugía menor	Cirugía mayor
<b>Predisposición del paciente</b>	Traumática y dolorosa	Muy aceptada y frecuente
<b>Rendimiento de tejido extraído</b>	Menor efectividad	Mayor efectividad
<b>Características de las células</b>	Misma potencialidad y capacidad replicativa.	Misma potencialidad y capacidad replicativa.



### III. LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSEO.

#### 1. Aislamiento de células madre derivadas de tejido adiposo.

Las células madre de tejido adiposo (ASC) pueden ser aisladas a partir del lipoaspirado obtenido en las intervenciones de liposucción, que normalmente es descartado como desecho médico, mediante digestión enzimática con colagenasa. El aumento de la obesidad en los últimos años ha hecho que el número de pacientes que se someten voluntariamente a este tipo de intervenciones haya crecido significativamente. Este hecho hace que las liposucciones sean consideradas como un procedimiento seguro y bien tolerado por los pacientes. Además, la cantidad de ASC que se puede obtener a partir de los lipoaspirados de grasa es mucho mayor comparado con los de médula ósea, alrededor de 2 millones de células por mililitro de lipoaspirado (Zuk y col., 2001). Así pues, mientras que de un gramo de grasa se extraen aproximadamente 5.000 células, la cantidad de BMSC que se puede obtener es de 100 a 1.000 células por gramo de médula ósea. Esto permite la posibilidad de que puedan ser trasplantadas sin la necesidad de mantenerlas en cultivo durante largos periodos de tiempo para expandirlas, lo cual puede ser problemático en aplicaciones clínicas por la posibilidad de contaminaciones microbianas, alteraciones celulares, introducción de productos animales (derivados del FBS utilizado durante el cultivo) y otros posibles errores humanos. Además, comparado con las BMSC, las ASC crecen más rápidamente y pueden mantenerse más tiempo en cultivo sin que presenten signos de senescencia (Kern y col., 2006). Todo esto hace que el tejido adiposo sea considerado una fuente rica en células madre y que las ASC sean una prometedora alternativa al uso de células madre embrionarias.

El tejido adiposo, al igual que la médula ósea, proviene del mesodermo embrionario y contiene una población heterogénea de células estromales. Las ASC proceden de esta fracción vasculo-estromal (SVF) del tejido adiposo, donde además se pueden encontrar otros tipos celulares como células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos, mastocitos, preadipocitos y otros tipos celulares circulantes como leucocitos o células madre hematopoyéticas (Tholpady y col., 2006). Esto hace que las ASC recién aisladas constituyan una mezcla relativamente heterogénea, pero manteniéndolas en cultivo y después de unos pocos pases, dan lugar finalmente a una población celular con aspecto fibroblástico más homogénea. Estas células primeramente

fueron denominadas PLA (del inglés “processed lipoaspirate”) o ADSC (“adipose derived stem cells”) y actualmente son conocidas como ASC. Sin embargo, muchos factores pueden influir en la composición celular de estos cultivos, como la edad y estado del donante, el procedimiento de aislamiento, las condiciones de cultivo o el número de pases.

A pesar de lo anteriormente expuesto, muchos grupos utilizan en sus estudios estas poblaciones relativamente homogéneas, suponiendo que la capacidad que poseen de adherencia a las superficies plásticas de cultivo, conducirá a una autoselección de la población durante los sucesivos pases. Sin embargo, esta capacidad de adherencia no es exclusiva de las ASC, ya que los fibroblastos por ejemplo también la tienen. Además, la elección de los reactivos y métodos experimentales pueden también afectar a los resultados de los estudios de expresión, diferenciación o capacidades terapéuticas de las ASC. Por estos motivos, parece razonable utilizar poblaciones de ASC purificadas para normalizar y ayudar a reducir muchas de las inconsistencias que existen en la actual literatura con respecto a las ASC. De esta forma los experimentos con estas células serían más reproducibles y permitirían, en consecuencia, que las aplicaciones clínicas se desarrollasen más rápidamente.

## **2. Caracterización.**

Las ASC son células con morfología fusiforme, similar a los fibroblastos, que se adhieren fuertemente a las superficies plásticas de cultivo y que tienen la capacidad de diferenciar a adipocitos, osteocitos y condrocitos bajo las condiciones adecuadas de cultivo. Poseen una tasa de crecimiento que se mantiene constante bajo condiciones de cultivo normales, tardando una media de 60 h en duplicar su población (Zuk y col., 2001), pero puede variar entre 2 y 5 días dependiendo de la edad del donante, condiciones de cultivo, densidad celular o composición del medio.

En cuanto a los marcadores de superficie celular, las ASC tienen un perfil de expresión similar a las BMSC (Gronthos y col., 2001), aunque también depende, como se ha dicho anteriormente, del tipo de población aislada y de las condiciones de cultivo.

Por lo general suelen expresar CD9, CD10, CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, entre otros. Por el contrario, no expresan los marcadores típicos hematopoyéticos CD14, CD34 y CD45. Al igual que las BMSC, las ASC expresan el antígeno leucocitario humano (HLA) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y no el de clase II. Finalmente, las ASC también expresan y secretan citocinas y factores de crecimiento (Rehman y col., 2004) como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento hepático (HGF) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ).

### **3. Capacidad de diferenciación *in vitro*.**

Las ASC son células madre multipotentes ya que pueden ser diferenciadas en distintos tipos celulares. Como células de origen mesodérmico que son, obviamente los linajes principales a los que se diferencian son el osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico (Zuk y col., 2001; Gimble y Guilak, 2003; Halvorsen y col., 2001; Huang y col., 2004), incluyendo músculo esquelético (Mizuno y col., 2002; Di Rocco y col., 2006), músculo liso (Rodríguez y col., 2006) y cardiomiocitos (Planat-Bernad y col., 2004; Fraser y col., 2006). Además, las ASC poseen también la capacidad de ser diferenciadas hacia linajes no mesodérmicos, de esta forma se pueden obtener células de origen ectodérmico como células neuronales (Safford y col., 2002; Zuk y col., 2002; Ashjian y col., 2003), células epiteliales (Brzoska y col., 2005) y células endoteliales (Planat-Bernard y col., 2004; Fraser y col., 2006), así como células de origen endodérmico como hepatocitos (Seo y col., 2005; Banas y col., 2007) y células pancreáticas (Timper y col., 2006).

La diferenciación de las ASC hacia todos estos tipos celulares, en la mayor parte de los casos, tiene lugar gracias a la adición de diversos factores de crecimiento y suplementos al medio de cultivo (Tabla 4). Aunque en algunos casos los protocolos están bien establecidos, como en la diferenciación hacia osteocitos, adipocitos y condrocitos, en otros la variabilidad y heterogeneidad de las poblaciones utilizadas hace muy difícil la repetitividad de los mismos. Con el propósito de disminuir la

heterogeneidad celular presente en los cultivos de ASC, se han obtenido poblaciones clonales originadas a partir de una única célula (single cell cloning), lo cual ha demostrado la existencia de clones con diferente potencial de diferenciación dentro de una población original heterogénea (Guilak y col., 2006; Paredes y col., 2010).

**Tabla 4. Protocolos coaxiales de diferenciación de células madre de tejido adiposo señalando los distintos suplementos añadidos al medio de cultivo.**

<b>Linaje celular</b>	<b>Suplementos</b>	<b>Referencias</b>
<b>Osteogénico</b>	Ácido ascórbico, $\beta$ -glicerofosfato, dexametasona/vitaminaD	Zuk, 2001 Halvorsen, 2001
<b>Adipogénico</b>	Indometacina, IBMX, dexametasona, insulina	Zuk, 2001
<b>Condrogénico</b>	Insulina, ácido ascórbico, TGF $\beta$ 1, transferrina	Huang, 2004
<b>Miogénico</b>	Dexametasona, hidrocortisona	Zuk, 2001
	Insulina, transferrina, BSA, mercaptoetanol	Planat-Bernad, 2004
<b>Neuronal</b>	Ácido valproico, hidrocortisona, KCl, BHA, insulina, forskolina	Safford, 2002
	Mercaptoetanol	Zuk, 2002
	IBMX, indometacina, insulina	Ashjian, 2003
<b>Hepático</b>	Transferrina, insulina, BSA, hidrocortisona, dexametasona, ácido ascórbico, EGF, HGF, FGF1, FGF4, OSM	Banas, 2007
	HGF, OSM, DMSO	Seo, 2005
<b>Pancreático</b>	Nicotinamina, activina A, exendina 4, pentagastrina, HGF	Timper, 2006

#### **4. Capacidad de regeneración tisular *in vivo*.**

Existen numerosos estudios que han demostrado la capacidad de las ASC, tanto de origen murino como humano, de reparar pequeños daños en tejidos *in vivo*. Gran parte de estos estudios están dirigidos a la reparación o regeneración de tejidos derivados de la capa mesodérmica, al ser células del mismo origen. Así pues, se pueden encontrar muchos trabajos de reparaciones óseas y cartilaginosa, algunos de ellos con la utilización de biomateriales como soporte para la regeneración de huesos (Hicok y col., 2004; Erickson y col., 2002; Nathan y col., 2003). Otros estudios relevantes son los basados en su capacidad de diferenciación miogénica, pudiendo encontrar trabajos sobre la capacidad de reparación de daños en fibras musculares tras una isquemia (Schuldt y col., 2008). Incluso existen estudios relacionados con la diferenciación neuronal (Kang y col., 2003).

Durante los últimos años se está estudiando la capacidad inmunomoduladora de las ASC, lo que ha abierto nuevas líneas de trabajo y la posibilidad de su utilización en patologías inflamatorias como la artritis reumatoide o la colitis intestinal (González y col., 2009; González-Rey y col., 2010), así como en la enfermedad de injerto contra huésped (Fang y col., 2006). A pesar de todos los estudios de este tipo realizados, los procesos biológicos sobre los que actúan las ASC son desconocidos, aunque sí se han observado sus efectos terapéuticos sobre los tejidos dañados, ya sea por su capacidad de diferenciación *in vivo*, por su capacidad de estimular los mecanismos endógenos de reparación de los propios tejidos o por su capacidad inmunomoduladora.

#### **5. Ensayos clínicos actuales.**

Los ensayos clínicos además de estar sometidos a una estricta regulación, tienen que ser de público conocimiento, para lo cual se deben inscribir en bases de datos oficiales. Existen varias bases de datos, como *Current Controlled Trials* o *Clinical Trials.gov* del Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos, en la que se incluyen la mayoría de los ensayos que se realizan en el mundo. Las búsquedas en este tipo de

bases muestran que de los más de 6.000 estudios en terapia celular que se están desarrollando en la actualidad (Septiembre 2010), alrededor de unos 70 trabajos utilizan células madre mesenquimales, de los cuales sólo 14 emplean células derivadas de grasa en el tratamiento de los pacientes. La mayor parte de estos ensayos clínicos se realizan con células derivadas de médula ósea aprovechando las infraestructuras que los servicios de hematología tienen para el trasplante de médula ósea. Pero centrándose en los ensayos con ASC, de los que se están realizando en la actualidad, las patologías más comúnmente tratadas son las fístulas y enfermedad de Crohn, con 5 ensayos de los cuales 2 se desarrollan en España; la diabetes y patologías asociadas, con 3 ensayos; y los infartos de miocardio y patologías cardiovasculares, con 2 ensayos cursándose actualmente. Aunque también se están tratando otras enfermedades como la esclerosis (ensayo que se está realizando en España), la lipodistrofia y la incontinencia fecal. También en el campo de la cirugía plástica se están usando estas células, por ejemplo para las reconstrucciones de mama tras una mastectomía o estéticamente para rellenar cicatrices, mejorar el contorno o disimular arrugas.

Los resultados definitivos de los diferentes ensayos clínicos se conocerán en los próximos años, pero algunos de ellos ya han dado resultados positivos y se han comentado en los medios de comunicación, como en el caso del tratamiento de cardiopatías, en las reconstrucciones de pecho y en el tratamiento de las fístulas. En este último caso, el Dr. García Olmo de la unidad de terapia celular del hospital la Paz, en colaboración con la empresa Cellerix, después de finalizar el ensayo clínico que comenzó en 2002 con enfermos de Crohn, esperan que para el año 2011 se autorice como medicamento el uso de estas células.

#### IV. INMUNOMODULACIÓN MEDIADA POR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.

##### 1. Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales.

Recientemente se ha revelado un efecto inmunomodulador y anti-inflamatorio de las células madre mesenquimales (MSC), tanto *in vitro* como *in vivo*. Estas propiedades apoyan su idoneidad para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como la diabetes tipo I (Abdi y col., 2008), o en inflamación como en el caso de la diabetes tipo II (Donath y col., 2008). Este efecto es debido a que las MSC parecen presentar una baja inmunogenicidad, expresando niveles intermedios de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y nula expresión para las de clase II, además de no presentar expresión para moléculas coestimuladoras como CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) y CD40 (Le Blanc y col., 2003). Por otra parte, las MSC pueden modular la actividad inmunológica de diferentes poblaciones celulares (Nauta y Fibbe, 2009). De esta forma, poseen un efecto inhibitor en la proliferación de linfocitos T y células NK, así como en la diferenciación de células dendríticas y linfocitos, pero por el contrario, muestran un efecto estimulador en la producción de linfocitos T reguladores CD8<sup>+</sup> (Aggarwal y Pittenger, 2008).

Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales las MSC modulan toda esta variedad de eventos no se conocen completamente. Además de necesitarse inicialmente un contacto célula-célula, parece que ciertos factores solubles tienen un papel clave en los procesos inmunes e inflamatorios. Entre ellos cabría mencionar el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), el factor de crecimiento hepático (HGF), la prostaglandina E2 (PGE2), el interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La mayoría de estos efectos inmunomoduladores han sido estudiados en poblaciones de MSC aisladas de médula ósea, pero también las derivadas de tejido adiposo pueden ejercer el mismo efecto (Puissant y col., 2005).

## 2. La interacción entre MSC y linfocitos T.

Las MSC ejercen su efecto sobre los linfocitos T inhibiendo la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> (cooperadores) y CD8<sup>+</sup> (citotóxicos), así como de células T de memoria y vírgenes (Di Nicola y col., 2002). Este mecanismo puede necesitar una fase inicial de contacto celular, junto con la producción de varios mediadores específicos como TGF- $\beta$ , HGF, PGE2 e IDO, además de ciertas citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2 y TNF- $\alpha$ . Esta inhibición parece ser dosis-dependiente, ya que se observa cuando existe un número alto de MSC (ratio MSC:linfocitos >1:10), pero si la cantidad es baja (1:100-1:10.000) puede inducir proliferación (Le Blanc y col., 2003). Esta habilidad de suprimir la respuesta mitogénica y antigénica de las células T se puede explicar mediante un complejo mecanismo que induce al mantenimiento de los linfocitos en un estado quiescente, sin inducción de apoptosis, a través del cual las MSC pueden determinar la inhibición de la expresión de la ciclina D2 y parar las células en fase G0-G1 del ciclo celular (Glennie y col., 2005). Además, las MSC pueden modular la respuesta inmune estimulando la producción de células T reguladoras (Treg), las cuales a su vez inhiben la proliferación de linfocitos en trasplantes alogénicos (Djouad y col., 2003).

Sin embargo, existen discrepancias en los distintos estudios sobre los mecanismos que median en la inmunosupresión, las cuales pueden deberse a las diferentes condiciones experimentales o al origen de las MSC (Ren y col., 2009). Aunque estos mecanismos no se conocen totalmente en su conjunto, en resumen, las MSC son capaces de inhibir la proliferación de células T, inhibir la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  e inducir un incremento en los niveles de IL-4 e IL-10. Todo esto hace cambiar una respuesta inmune pro-inflamatoria hacia un estado anti-inflamatorio, lo cual se favorece aún más por la estimulación de los linfocitos Treg y la alteración en la actividad de las células dendríticas.



### **3. Modulación de las células dendríticas.**

Las MSC pueden indirectamente reducir la activación de células T a través de la inhibición de la diferenciación de células dendríticas (DC) o células presentadoras de antígenos (APC), las cuales juegan un papel clave en la inducción de la inmunidad y tolerancia, dependiendo de su activación y estado de maduración. Las DC maduras son altamente eficaces en la captación de antígenos, los cuales primero los procesan y después los presentan, induciendo el desarrollo de células T efectoras. Las DC inmaduras inducen tolerancia, ya sea por la eliminación de linfocitos T o por la expansión de Treg (Banchereau y col., 2000).

Las MSC son capaces de interferir en la diferenciación, maduración y función de las DC, provocando el bloqueo de éstas en el estado inmaduro y alterando la secreción de citocinas. Por ejemplo, pueden reducir la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y aumentar la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10. En cuanto a los mecanismos a través de los cuales las MSC median en la modulación de las DC, no está claro si es dependiente de contacto celular o no, pero parece que ciertos factores solubles producidos por las MSC como la IL-6 y M-CSF tienen un papel importante en la retención del estado inmaduro (Jiang y col., 2005).

### **4. Efectos de las MSC en linfocitos B.**

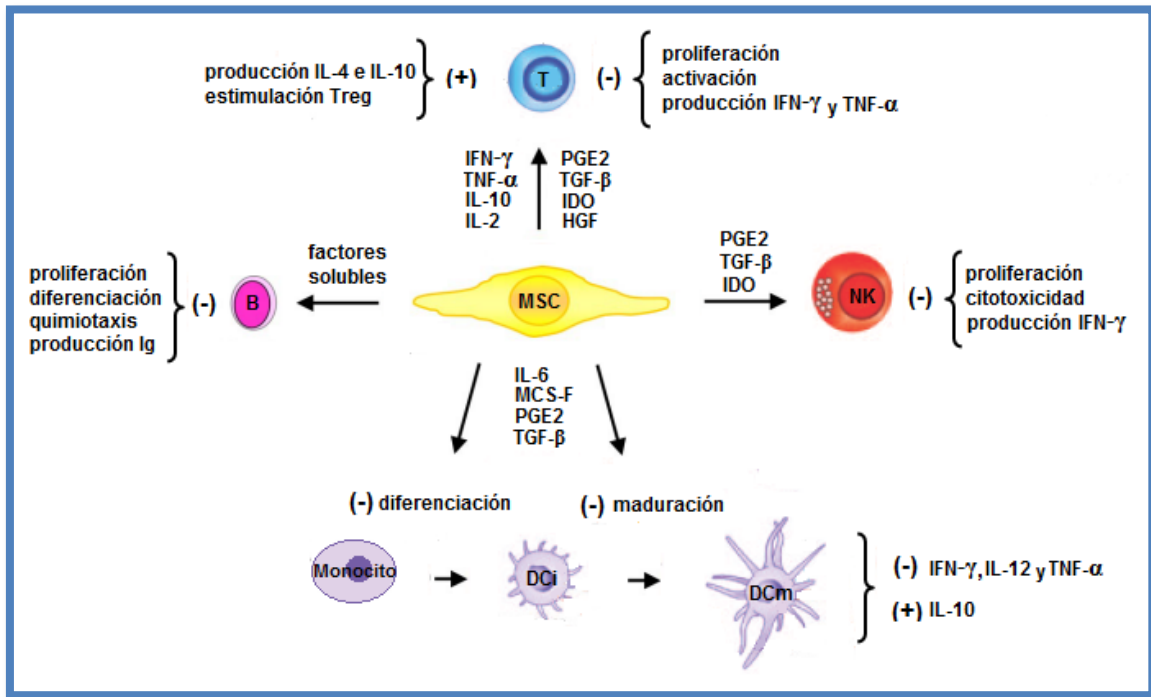
Las MSC pueden inhibir la proliferación y activación de linfocitos B de una forma dosis-dependiente, así como modular su diferenciación y producción de anticuerpos (Corcione y col., 2006). Al igual que sucede con las células T, las células B quedan detenidas en fase G0-G1 del ciclo celular, sin entrar en apoptosis. Las MSC pueden inhibir la producción de inmunoglobulinas M, G y A, pero por el contrario, la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 por parte de los linfocitos B no es alterada. Además su comportamiento quimiotáctico puede verse afectado, disminuyendo su migración a órganos linfoides secundarios.

Aunque los mecanismos implicados no se conocen completamente, todos estos efectos de las MSC sobre células B parecen estar mediados por factores solubles, aunque éstos no han sido identificados todavía. Sin embargo, otros estudios sugieren que las MSC son capaces de suprimir la proliferación de células B sólo en presencia de IFN- $\gamma$  (Krampera y col., 2006). La discrepancia en los distintos trabajos, se puede atribuir de nuevo a la variabilidad en los protocolos utilizados.

## 5. Interacción entre MSC y células NK.

Las células NK (“natural killer” o asesina natural) juegan un papel crucial en la defensa del huésped contra las células infectadas o tumorales. Ejercen su función a través de la secreción de citocinas y quimioquinas. Son citolíticas, es decir, destruyen a las otras células atacando su membrana celular y provocando la lisis. Además tienen una función citotóxica dependiente de anticuerpos. La acción de las células NK es regulada mediante el balance de señales transmitidas a través de receptores activadores e inhibidores que interaccionan con moléculas HLA de las células diana (Papamichail y col., 2004).

Experimentos con cocultivos a través de membranas semipermeables (“transwell”) indican que las MSC son capaces de inhibir la producción de citocinas (como IFN $\gamma$ ) y la proliferación de células NK estimuladas con IL-15 a través de factores solubles (incluyendo TGF- $\beta$  y PGE2). Por el contrario, el efecto inhibitor de las MSC en la citotoxicidad de las células NK parece requerir el contacto célula-célula, sugiriendo la existencia de diferentes mecanismos en la modulación de estas células (Sotiropoulou y col., 2008). Aunque los estudios iniciales han mostrado que las MSC no son lisadas por células NK recién aisladas, otros estudios indican que estas células activadas por IL-2, IL-15, IL-12 ó IL-18 tienen una potente actividad citolítica frente a MSC autólogas o alogénicas (Spaggiari y col., 2006). Sin embargo, el tratamiento de MSC con IFN- $\gamma$  las hace menos susceptibles a la lisis, debido al efecto que tiene dicho factor en la regulación de las moléculas HLA clase I.



Esquema 5. Efectos inmunomoduladores de las células madre mesenquimales.  
DCi: célula dendrítica inmadura, DCm: célula dendrítica madura, (-): inhibición, (+): estimulación.





*OBJETIVOS*

**I. OBJETIVO GENERAL.**

El objetivo principal de este trabajo es analizar la plasticidad de poblaciones clonales de células madre mesenquimales humanas aisladas de lipoaspirados (h\_ASC) a la hora de diferenciar a distintos linajes y evaluar finalmente su potencial en terapia celular.

**II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1.- Aislar diversos clones de h\_ASC de distintos donantes y caracterizarlos, tanto funcionalmente como en base a su perfil de expresión génica.
- 2.- Valorar su plasticidad a la hora de diferenciar a distintos linajes, incluyendo mesodermo y neuroectodermo.
- 3.- Estudiar el potencial de las células madre de tejido adiposo en terapia celular, en base a su capacidad de modular la respuesta inflamatoria e inmunitaria.



*MATERIALES Y MÉTODOS*

## **I. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR.**

### **1. Líneas celulares.**

Se han utilizado cultivos de líneas de células madre adultas aisladas de tejido adiposo humano (h\_ASC) obtenidas en nuestro laboratorio.

### **2. Obtención de células madre de tejido adiposo.**

La obtención de células madre adultas aisladas a partir de lipoaspirados humanos se realizó según el protocolo de Zuk y colaboradores de 2001. Los lipoaspirados obtenidos por liposucción, bajo anestesia local y en condiciones estériles, se trasladaron en hielo desde la clínica de cirugía estética colaboradora hasta nuestro laboratorio donde, manteniendo siempre la esterilidad, se inició el protocolo de aislamiento partiendo de una cantidad inicial de 100 ó 200 ml de lipoaspirado.

El protocolo se inició lavando varias veces el lipoaspirado con igual volumen de PBS. En cada lavado se recogió sólo la parte grasa y se pasó a otro recipiente con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de sangre y líquidos (anestesia, plasma, restos celulares, etc.). Se recogió la grasa limpia de restos y se añadió, para digerir la matriz extracelular, entre 40 y 80 ml de solución de colagenasa en PBS conteniendo 0,075% de colagenasa V (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y 5 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Alemania). Se dejó actuar durante 30 min a 37° C y en agitación.

La actividad enzimática se neutralizó añadiendo el doble de volumen de medio de cultivo mesenquimal. A continuación se centrifugó a 175xg durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio de cultivo mesenquimal. Si el precipitado se observa que no está muy limpio de restos celulares e impurezas se puede filtrar a través de una doble gasa estéril.

Para saber la cantidad de células aisladas se hizo un recuento celular del filtrado con una cámara de Neubauer y se sembró en placas de poliestireno pretratadas de 100

mm Ø a una densidad de 1 millón de células por placa, con medio de cultivo mesenquimal y se incubó a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridas 24 h se lavaron las placas con PBS para eliminar las células no adheridas y se volvió a añadir medio de cultivo mesenquimal. El medio de cultivo se cambió 2-3 veces por semana hasta que las células alcanzaron el 80% de confluencia. Alcanzada esta confluencia las células se pueden tripsinizar y expandir o bien congelar con el correspondiente medio de congelación en nitrógeno líquido.

### **3. Selección clonal de células madre de tejido adiposo.**

Una vez aisladas las células madre derivadas de tejido adiposo se procedió a la obtención de poblaciones celulares procedentes de una única célula (single cell cloning). Para ello las h\_ASC se sembraron en placas de poliestireno a muy baja confluencia (500-1.000 células en placas de 100 mm Ø) de esta forma, al estar tan diluidas, quedan lo suficientemente separadas como para identificar células aisladas. Estas células se marcaron en la placa para seguir su crecimiento hasta que llegaron a formar colonias bien definidas, manteniéndose en medio de cultivo para clonaje. Una vez que el tamaño de la colonia fue lo suficientemente grande (50-100 células) se procedió a la tripsinización. Para ello se lavaron las placas 2 veces con PBS y después del último lavado se puso un anillo de clonaje (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), previamente engrasado, rodeando el clon a tripsinizar. Una vez fijado el anillo de clonaje (Imagen 1) a la placa se añadieron 50 µl de tripsina y se dejó 5 min a 37° C en el incubador. Se paró la reacción de la tripsina con otros 50 µl de medio de cultivo y se pasó todo el volumen, con cuidado de no mover el anillo de clonaje, a un pocillo de una placa de 24 pocillos con 0,5 ml de medio de cultivo. Cuando alcanzaron el 80% de confluencia en el pocillo se procedió de nuevo a su tripsinización, sembrando ahora en placas de 60 mm Ø. Cuando volvieron a estar confluentes se pasaron a placas de 100 mm Ø, donde se expandió el clon en medio de cultivo mesenquimal hasta tener suficientes células para congelar.





Imagen 1. Anillos de clonaje.

#### 4. Medios de cultivo.

En la tabla 1 se indican los componentes de los medios utilizados para el cultivo de células madre aisladas de tejido adiposo, todos de la casa Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) excepto el suero fetal bovino (Biowhittacker, Cambrex BioScience, Verviers, Bélgica).

Tabla 5. Medios de cultivo.

Reactivos	Stock	Medio Mesenquimal	Medio de Clonaje
<b>DMEM (25mM glucosa)</b>	1x	1x	-
<b>Suero Fetal Bovino</b>	100%	10%	20%
<b>Penicilina/Estreptomicina</b>	100x	1x	1x
<b>Hepes</b>	1 M	-	15 mM
<b>HAM F12</b>	1x	-	1x

#### 5. Descongelación de células.

Las células, preservadas en crioviales en nitrógeno líquido, se descongelaron suavemente en un baño a 37° C, procurando que no llegaran a calentarse para minimizar la muerte celular durante este proceso. El contenido del criovial se pasó a un tubo de fondo cónico con 8 ml de medio de cultivo mesenquimal, para diluir así el DMSO presente en el medio de congelación. El tubo se centrifugó a 100xg durante 5 min. Tras

eliminar el sobrenadante las células se resuspendieron en un volumen de medio adecuado para sembrarlas en el número de placas y a la concentración deseada.

Tras 24 h de incubación a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> se cambió el medio de cultivo para retirar las células muertas no adheridas a la placa.

## 6. Mantenimiento del cultivo y tripsinización.

Las células madre derivadas de tejido adiposo se cultivaron en placas de poliestireno pretratadas (TPP, Trasadingen, Suiza) a una densidad aproximada de 3.000 células/cm<sup>2</sup> (200.000 células/placa 100 mm Ø) y se mantuvieron en cultivo a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, realizando cambios de medio unas 2 veces por semana, hasta alcanzar un máximo de confluencia del 90%.

Cuando las células llegaron a cubrir casi la totalidad de la superficie de la placa (90% confluencia) se despegaron por tripsinización (tabla 2) para poder resembrarlas. Para ello se retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con PBS, para eliminar los restos de suero del medio que pudieran inhibir la acción de la tripsina. Tras retirar el PBS se adicionó la solución de 0,05% de tripsina y 0,002% de Na<sub>4</sub>EDTA (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células se incubaron durante 5 min a 37° C y posteriormente se paró la reacción con medio de cultivo mesenquimal. Todo el volumen se pasó a un tubo de fondo cónico y se pipeteó suavemente varias veces para resuspender bien las células. La placa se puede volver a lavar con medio de cultivo para recoger todas las células posibles, pero con cuidado de no diluir demasiado la suspensión celular final y afecte así al contaje celular.

En el caso de que el cultivo en placa se deje muchos días y que el crecimiento y proliferación de las células sea muy largo, se recomienda la recogida de las mismas no por tripsinización sino mediante el uso de un raspador de células, ya que éstas suelen estar muy adheridas.

Tabla 6. Volúmenes aconsejados en la tripsinización.

Tamaño Placa	Volumen Tripsina	Volumen Parada	Volumen Lavado
Placa 100 mm Ø	1,5 ml	2 ml	2 ml
Placa 60 mm Ø	0,75 ml	1 ml	1 ml
Placa 6 pocillos	0,5 ml	1 ml	1 ml
Placa 24 pocillos	250 µl	500 µl	500 µl

### 7. Contaje y viabilidad celular.

Para contar las células viables en una suspensión celular se utilizó el método de exclusión del azul tripan. Para ello, se mezclaron 20 µl de la suspensión celular con 20 µl de una solución de colorante vital azul tripan al 0,4% en PBS (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tras mezclarlo bien se cargó 20 µl de dicha dilución en una cámara de Neubauer y se procedió a contar las células en el microscopio. Se consideraron células viables aquellas que presentasen un perímetro más o menos circular, con borde regular y sin tinción azul.

La cámara de Neubauer es utilizada para el recuento celular en medio líquido. Se trata de un portaobjetos con dos zonas ligeramente deprimidas para evacuar el exceso de líquido, en cada una de las cuales hay marcada una cuadrícula de dimensiones conocidas. La cámara se cubre con un cubreobjetos que se adhiere por simple tensión superficial, dando cabida a un volumen de líquido conocido. En base a la cantidad de células contadas y según el volumen de líquido que admite la cámara, se puede calcular la concentración de células por unidad de volumen en la muestra inicial, la cual viene dada por la siguiente fórmula simplificada:

$$\text{Concentración (células/ml)} = M \times \text{dilución} \times 10.000$$

Donde M es la media de las células contadas por cuadrado grande (compuesto por 16 cuadrados más pequeños) de la cámara de recuento. La dilución se toma siempre como 2, ya que la relación en la mezcla entre suspensión celular y azul tripan es 1:1.

## 8. Congelación de células.

Para congelar un número determinado de células, después de haber realizado la tripsinización y contaje celular, se centrifugó la suspensión celular a 100xg durante 5 min y tras eliminar el sobrenadante se resuspendió el precipitado en un volumen conocido de medio de congelación para obtener una concentración determinada de células por unidad de volumen (normalmente  $0,5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^6$  células/ml). El medio de congelación se compone de medio de cultivo mesenquimal suplementado con un 10% más de suero fetal bovino y 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Tras resuspender las células en el medio de congelación, se pipeteó 1 ml de la suspensión por criovial de 2 ml (TPP, Trasadingen, Suiza) y se introdujeron los crioviales en un “Mr. Frosty” (Nalgene, Rochester, NY, USA) para mantenerlo a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 h en un ultracongelador. El Mr. Frosty es un recipiente que contiene isopropanol y permite un descenso gradual de la temperatura hasta la congelación, minimizando la formación de cristales y por tanto, el daño y muerte celular durante este proceso.

Finalmente, tras 24 h a  $-80^{\circ}\text{C}$ , los crioviales se guardaron en una caja dentro de un bidón con nitrógeno líquido (Locator Jr, Nalgene, Rochester, NY, USA) para su conservación a  $-196^{\circ}\text{C}$  hasta su nueva utilización.

## 9. Protocolos de diferenciación.

Las células madre aisladas de tejido adiposo humano (h\_ASC) se sometieron a distintos protocolos de diferenciación celular con el fin de obtener tipos celulares propios de las capas embrionarias mesodérmica y ectodérmica.

### 9.1. Protocolos de diferenciación a linaje mesodérmico.

Las células h\_ASC se sometieron a dos protocolos de diferenciación a linaje mesodérmico, uno hacia la línea osteogénica y otro hacia la adipogénica.

La diferenciación osteogénica se realizó según el protocolo de Jaiswal y colaboradores de 1997. Para ello, las células se sembraron en placas y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron el 100% de confluencia. Una vez confluentes se inició la diferenciación, cambiando el medio de cultivo mesenquimal por medio de cultivo inductor, compuesto por medio de cultivo mesenquimal suplementado con 0,2 mM de ácido ascórbico-2-fosfato, 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato y  $10^{-7}$  M de dexametasona (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). El cultivo se mantuvo hasta los 25 días con cambios de medio cada 3-4 días. Finalizado el protocolo se pudo valorar el grado de diferenciación mediante tinción con alizarina.

La diferenciación adipogénica se realizó según el protocolo de Pittenger de 1998. De la misma forma, el protocolo no se inició hasta que las células no alcanzaron el 100% de confluencia. Una vez confluentes se añadió el medio de cultivo inductor de adipogénesis compuesto por medio de cultivo mesenquimal suplementado con 1  $\mu$ M de dexametasona, 0,5 mM de isobutil-metilxantina (IBMX), 10  $\mu$ g/ml de insulina y 100  $\mu$ M de indometacina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). El cultivo se mantuvo durante 21 días con cambios de medio cada 2-3 días. Una vez finalizado el protocolo se pudo analizar la inducción adipogénica mediante tinción con oil red.

Tabla 7. Medios de diferenciación a linaje mesodérmico.

Reactivos	Stock	Medio Osteogénico	Medio Adipogénico
<b>DMEM (25mM glucosa)</b>	1x	1x	1x
<b>Suero Fetal Bovino</b>	100%	10%	10%
<b>Penicilina/Estreptomicina</b>	100x	1x	1x
<b>Ácido Ascórbico</b>	20 mM	0,2 mM	-
<b><math>\beta</math>-Glicerofosfato</b>	1 M	10 mM	-
<b>Dexametasona</b>	10 mM	0,1 $\mu$ M	1 $\mu$ M
<b>IBMX</b>	0,5 M	-	0,5 mM
<b>Insulina</b>	10 mg/ml	-	10 $\mu$ g/ml
<b>Indometacina</b>	10 mM	-	100 $\mu$ M

## 9.2. Protocolo de diferenciación a linaje ectodérmico.

Para la diferenciación hacia linaje neuronal se procedió según las instrucciones del kit AdvanceSTEM de diferenciación neural de la casa comercial Thermo Scientific (Hyclone, Logan, UT, USA). Para ello, se sembraron las células en placas de 6 pocillos a una densidad aproximada de 600 células/cm<sup>2</sup> (5.000-6.000 células/pocillo) y se incubaron a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para que las células recuperaran su morfología o hasta que alcanzaran el 30% de confluencia. Alcanzada ésta se eliminó el medio mesenquimal, se lavaron las células con PBS y se añadieron 2 ml por pocillo de medio de diferenciación neuronal, compuesto por AdvanceStem Neural Differentiation Medium suplementado con un 10% de AdvanceStem Stem Cell Growth Supplement (Hyclone, Logan, UT, USA). Las células se dejaron 72 h incubando a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas 24 h pudo observarse la formación de células con morfología neuronal, alcanzándose el máximo a las 72 h.

## **10. Microscopía.**

Para la observación de las células sobre placas de poliestireno se utilizó un microscopio invertido de contraste de fases marca Nikon (Badhoevedorp, Holanda), modelo Eclipse TE 200, unido a una cámara digital Kappa DX 30 (Kappa, Gleichen, Alemania). El programa informático utilizado para la visualización de las imágenes en este microscopio fue el Kappa Image Base, versión 2.5.2.



## II. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

### 1. Extracción de ARN total.

Para la extracción de ARN total de células h\_ASC se utilizó el reactivo tripure (Roche, Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante con algunas modificaciones. Una vez obtenido el precipitado de células, que para el caso de h\_ASC debe ser como mínimo de  $0,5 \times 10^6$ , en un eppendorf libre de ARNasas se procedió según los siguientes pasos:

- 1.- Añadir 0,8 ml de tripure, si hay más de 1 millón de células añadir 1 ml.
- 2.- Lisar las células repipeteando.
- 3.- Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 4.- Añadir 160  $\mu$ l de cloroformo y agitar vigorosamente durante 15 s.
- 5.- Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 6.- Separar las fases por centrifugación a 12.000xg durante 15 min a 4° C.
- 7.- Transferir 400  $\mu$ l de la fase superior incolora a un eppendorf libre de ARNasas.
- 8.- Añadir 400  $\mu$ l de isopropanol a -20° C (500  $\mu$ l si el precipitado es mayor de 1 millón de células) e invertir varias veces.
- 9.- Dejar incubar 10 min a -20° C para que precipite el ARN.
- 10.- Centrifugar a 12.000xg durante 10 min a 4°C.
- 11.- Eliminar el sobrenadante y añadir 0,8 ml de etanol al 75% en agua tratada con DEPC a -20°C (1 ml si el precipitado es mayor de 1 millón de células).
- 12.- Agitar con vortex brevemente para lavar bien el precipitado.
- 13.- Centrifugar a 7.500xg durante 5 min a 4° C.
- 14.- Descartar el sobrenadante y eliminar bien el etanol con ayuda de una pipeta.
- 15.- Dejar secar el precipitado de ARN al aire durante aproximadamente 10 min.
- 16.- Resuspender el pellet en 25  $\mu$ l de agua tratada con DEPC.
- 17.- Incubar a 58° C durante 12 min y guardar a -80° C.



Para precipitados de tamaño inferior a 500.000 células la extracción del ARN total se realizó mediante el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante:

- 1.- Lisar las células añadiendo 350  $\mu$ l de tampón RLT (si hay menos de 100.000 células añadir 75  $\mu$ l) y pipetear o agitar con vortex durante 1 min.
- 2.- Homogeneizar el lisado mecánicamente con ayuda de un rotor y una varilla de plástico autoclavada durante 1 min a máxima velocidad (si hay menos de 500 células añadir 20 ng de ARN carrier del kit antes de homogeneizar).
- 3.- Añadir el mismo volumen de etanol al 70% que de RLT y mezclar bien por pipeteo.
- 4.- Transferir todo el volumen a una columna del kit colocada sobre un tubo colector de 2 ml y centrifugar a 8.000xg durante 15 s.
- 5.- Descartar el eluido y añadir 350  $\mu$ l de tampón RW1.
- 6.- Centrifugar a 8.000xg durante 15 s y descartar el eluido.
- 7.- Añadir en un eppendorf estéril 10  $\mu$ l de ADNasa del kit y 70  $\mu$ l de tampón RDD, mezclar invirtiendo el tubo varias veces y transferir todo el volumen sobre la membrana de la columna.
- 8.- Dejar incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
- 9.- Añadir 350  $\mu$ l de tampón RW1 y centrifugar a 8.000xg durante 15 s.
- 10.- Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2 ml y añadir 500  $\mu$ l de tampón RPE.
- 11.- Centrifugar a 8.000xg durante 15 s y descartar el eluido.
- 12.- Añadir 500  $\mu$ l de etanol al 80% y centrifugar a 8.000xg durante 2 min.
- 13.- Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2 ml y centrifugar con la tapa de la columna abierta a máxima velocidad durante 5 min.
- 14.- Transferir la columna a un tubo de 1,5 ml del kit y añadir 14  $\mu$ l de agua libre de ARNasas del kit al centro de la membrana.
- 15.- Dejar incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- 16.- Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min y descartar la columna.

El eluido final de aproximadamente 12  $\mu$ l contiene el ARN, el cual se guardó a -80° C para su conservación.

## 2. Medida de la concentración de ARN total.

El ARN obtenido se cuantificó determinando su densidad óptica a 260 nm por medio de un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (BioRad, CA, USA). Para ello el ARN se diluyó en tampón TNE 1x (10 mM Tris pH 7,4; 0,2 M NaCl y 1 mM EDTA) a una concentración 1:200. Se debe obtener una relación entre las absorbancias a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm cercana a 2.

## 3. Retrotranscripción de los ARNs mensajeros.

Tras la extracción del ARN total se procedió a la obtención del ADN complementario a partir de 1 µg de ARN total y usando la enzima Expand Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim, Alemania). Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- 1.- Poner 1 µg de ARN total en un eppendorf libre de ARNasas.
- 2.- Añadir OligodTs (Roche, Mannheim, Alemania) a una concentración final de 1,9 µM.
- 3.- Añadir agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 10,5 µl.
- 4.- Incubar en un termociclador a 65° C durante 10 min para que tenga lugar la hibridación de los oligodTs a las colas de poliA de los ARN mensajeros.
- 5.- Añadir a la mezcla anterior una concentración final de: tampón de reacción 1x, DTT 10 mM, dNTPs 1 mM (Takara, Shiga, Japón), 20 U de Inhibidor de ARNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 50 U de enzima Expand Reverse Transcriptase; en un volumen final de 20 µl.
- 6.- Incubar en un termociclador a 37° C durante 60 min y seguidamente a 93° C durante 5 min para inactivar la enzima.
- 7.- Guardar a -20° C.

#### 4. Diseño de cebadores para RT-PCR.

Los cebadores usados en el presente trabajo se diseñaron con el programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, CA, USA) y se solicitaron a la empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Para el diseño de los cebadores se siguieron las siguientes pautas:

- 1.- El tamaño de cada cebador es de aproximadamente 20 pares de bases.
- 2.- La composición de G+C en cada cebador no supone más del 60% de las bases totales.
- 3.- La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de cada cebador está entre 60 y 70° C.
- 4.- El extremo 5' se intenta iniciar en G o C para aumentar la eficiencia de la hibridación.
- 5.- El tamaño del producto amplificado para una PCR convencional se diseña en torno a 100 – 600 pares de bases y si es para PCR a tiempo real entre 100 y 150 pares de bases.
- 6.- Se comprueban las posibles hibridaciones entre los cebadores (dímeros de cebadores) y dentro de los cebadores (horquillas), ya que disminuyen la eficiencia de la reacción y generan artefactos de amplificación.
- 7.- Se comprueban posibles hibridaciones con otros ADNs por medio del programa en red BLAST, proporcionado por el NIH (National Institute of Health USA).

Los cebadores son enviados liofilizados por la empresa fabricante. Tras su recepción se resuspenden en campana con tampón TE (10 mM Tris y 2 mM EDTA pH 7,5) a una concentración final de 100  $\mu$ M (100 pmoles/ $\mu$ l) para cada cebador (sentido y antisentido) y se realizan diluciones de trabajo de cada cebador a 25  $\mu$ M con tampón TE. Los stocks de cada cebador así como las alícuotas se guardan a – 20° C.

Tabla 8. Cebadores y condiciones de PCR.

	Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Ta (°C)	Ciclos	Amplicón (pb)
PCR CONVENCIONAL	ABCG 2	gtttatccgtgggtgtctg	ctgagctatagaggcctggg	63	35	684
	Actina beta	tcaccaccagggccgagcg	tctcctctgcatcctgtcg	55	35	351
	Aggrecan	cactgttaccgccacttccc	accagcggaggtcccctcg	60	28	183
	BMP 2	cctaaggcatgctgtgtcccacaga	gtactagcgacaccacaacctcca	64	35	126
	BSP	cagcttccaagaaggctgggg	tggtgccgtttatgccttgtcg	64	35	148
	c-MYC	accagcagcactctgaggaggaa	ggtgcattttcggttgttctga	63	35	288
	Colageno I	agggtccaacgagatcgagatccg	tacaggaagcagacaggccaacgtcg	60	22	222
	Colageno X	agccaggggtgccaggacca	tttcccactccaggagggc	60	40	385
	ENS	attaggcaaaggtgtcctgaagg	tcaccagctccaaggcttca	55	40	511
	Nanog	ctgtgatttggggcctgaa	tgtttgcctttgggactggt	60	35	153
	NF-H	aggagtgggtccgagtgggct	tgtgaatgcttctgttagg	58	35	229
	NF-M	tcgctgcgtacagaaaactcctgga	aatggctgcaggcctcgccat	57	40	236
	OCT 3/4	cttgcctgcagaagtggtggaggaa	ctgcagtgtgggttccggca	60	35	169
	Osteocalcina	atgagagccctcacactcctc	cgtagaagcggcctgataggc	63	36	128
	Osteonectina	ctacatcgggccttgcaata	gggtgaccaggacgttcttg	62	30	101
	Osteopontina	ttgctttgcctcctagga	gtgaaaactcgggtgctgg	60	36	423
	Osterix	ggcacaagaagccgtactc	cactgggcagacagtcagaa	60	36	246
	Rex 1	tgaagcccacatcctaagc	caagtatacctcctgctttgg	60	35	559
	Runx 2	ccgtggtcctatgaccagtcttacc	gtgcatcatctgaaatgcgcctagg	60	35	146
Sox 2	gccgagtggaaactttgtc	gttcatgtgcgcgtaactgt	56	45	264	
Sox 9	gaacgcacatcaagacggag	tctcgttgattcgtctc	60	35	630	
PCR CUANTITATIVA	Actina beta	cctggagaagagctacgagctg	ctccatgccagggaaggag	60	40	106
	GAPDH	gcaatgcctcctgcaccacca	cggaggggccatccacagtct	60	40	135
	ALP (GAPDH)	cggcctggacctcgttgaca	tcccctggctcgaagagacc	60	40	138
	LPL (Actina)	taagaagtccaggtgaaactggcgga	caggaaaaatccactttgaaacacccc	61	40	135
	Osteocalcina (Actina)	ctggccaggcaggtgcgaag	tggggctcccagccattgat	63	40	128
	Osteonectina (GAPDH)	cgcattcgggactggctcaa	atcttctcaccgcagcttctgc	61	40	100
	Runx 2 (GAPDH)	ccgtggtcctatgaccagtcttacc	gtgcatcatctgaaatgcgcctagg	60	40	146

## 5. RT-PCR convencional.

Para la reacción de polimerización se utilizó el kit Expand High Fidelity (Roche, Mannheim, Alemania). Se utilizó como molde 1  $\mu$ l de ADN complementario y se añadieron los siguientes reactivos:

- 1.- 1x de tampón con  $MgCl_2$ .
- 2.- 0,2 mM dNTPs (Takara, Shiga, Japón).
- 3.- 0,5 mM de cada cebador.
- 4.- 1,3 unidades de enzima.
- 5.- Agua bidestilada estéril hasta 25  $\mu$ l.

La amplificación de los ADN complementarios se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA). Se utilizó el siguiente protocolo de amplificación, donde varía la temperatura de hibridación ( $T_a$ ) que es específica para cada cebador y el número de ciclos:

Tabla 9. Protocolo de amplificación para RT-PCR convencional.

	1 Ciclo	n Ciclos	1 Ciclo
<b>Segmentos</b>	95° C / 5 min	94° C / 0,5 min	72° C / 10 min
		$T_a$ ° C / 0,5 min	
		72° C / 1,5 min	

Los productos de PCR obtenidos se analizaron corriendo 12,5  $\mu$ l de la reacción suplementado con tampón de carga 1x (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) en un gel de agarosa (Seakem LE, Cambrex, Rockland, USA) al 2% con 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio (Amresco, Slon, Ohio, USA) en tampón TBE 0,5x (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Los productos de PCR se visualizaron por exposición a la luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc 2000 (BioRad, CA, USA) y las imágenes se obtuvieron mediante el programa GelQuant (BioRad, CA, USA).

## 6. RT-PCR a tiempo real.

Para el análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real se utilizó el kit LightCycler FastStart DNA MasterPlus Syber Green I (Roche, Mannheim, Alemania). Se utilizó como molde 1  $\mu$ l de ADN complementario y se añadieron los siguientes reactivos:

- 1.- 0,5  $\mu$ M de cada cebador.
- 2.- 20% de Master Mix (SyberGreen, polimerasa, dNTPs y tampón, proporcionado por el fabricante del kit).
- 3.- Agua bidestilada estéril hasta 10  $\mu$ l.

La amplificación de los ADN complementarios se realizó en el termociclador Light Cycler (Roche, Mannheim, Alemania). Se utilizó el siguiente protocolo de amplificación, donde varía la temperatura de hibridación ( $T_a$ ) que es específica para cada cebador:

Tabla 10. Protocolo de amplificación para RT-PCR a tiempo real.

	1 Ciclo	40 Ciclos	1 Ciclo
<b>Segmentos</b>	95° C / 10 min	94° C / 10 s	95° C / 0 s
		$T_a$ ° C / 7 s	63° C / 15 s
		72° C / 12 s	95° C / 0 s

Los resultados se analizaron con el software Light Cycler 4.0 (Roche, Mannheim, Alemania). Como “housekeeping” se utilizaron los genes de beta actina y GAPDH, según el gen a estudiar (Tabla 8). Se comprobó que los productos de amplificación obtenidos eran específicos mediante la curva de fusión y se cuantificó la expresión relativa de los genes según el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  publicado por Livak y Schmittgen en 2001, tras comprobar que las eficacias de amplificación del gen a estudiar y el “housekeeping” eran similares.

### III. TINCIONES CELULARES.

#### 1. Tinción con *Alizarin Red S*.

La tinción con rojo de alizarina se utilizó para evaluar los depósitos minerales ricos en calcio durante los procesos de osteogénesis en cultivos derivados de células h\_ASC. Además de poder detectar visualmente si se han dado procesos de mineralización en el cultivo celular, se puede cuantificar mediante la extracción del tinte con ácido acético y la neutralización con hidróxido de amonio, seguido de una detección colorimétrica a 405 nm. Para ello se utilizó el kit Osteogenesis Quantitation de Chemicon (Millipore, Billerica, MA, USA) y la lectura de la densidad óptica se realizó en un lector de placas  $\mu$ Quant Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), siguiendo las instrucciones siguientes:

- 1.- Aspirar el medio de las placas, con cuidado de no levantar las células o los depósitos que pudiera haber sobre ellas.
- 2.- Lavar una vez con PBS durante 2-3 min.
- 3.- Fijar las células con solución de formaldehído al 10% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente.
- 4.- Eliminar suavemente el fijador y lavar con mucho cuidado con agua destilada. Realizar 3 lavados de 10 min para eliminar bien todo el fijador.
- 5.- Teñir con 1 ml de la solución de rojo de alizarina durante 20 min a temperatura ambiente.
- 6.- Eliminar la alizarina y lavar con agua destilada en agitación muy suave. Realizar 4 lavados de 10 min.
- 7.- Después del último lavado añadir agua destilada para evitar que las células se sequen. Las placas están ahora preparadas para proceder a su visualización y obtención de fotografías. Las células diferenciadas que contengan depósitos minerales se habrán teñido de rojo muy intenso.
- 8.- Añadir 400  $\mu$ l de ácido acético al 10% para extraer el tinte y proceder a su cuantificación. Dejar 30 min a temperatura ambiente en agitación.
- 9.- Raspar con cuidado las células para despegarlas de la placa y pasar todo el volumen a un eppendorf de 1,5 ml.
- 10.- Agitar con vortex fuerte durante 1 min.

- 11.- Calentar a 85° C durante 10 min.
- 12.- Incubar 5 min en hielo.
- 13.- Centrifugar a 16.000xg durante 15 min.
- 14.- Coger 400 µl del sobrenadante y pasarlos a un tubo nuevo.
- 15.- Neutralizar añadiendo 150 µl de hidróxido de amonio al 10%. Coger una pequeña alícuota y medir pH (debe estar entre 4,1-4,5).
- 16.- Coger 150 µl y ponerlos en un pocillo de una placa de 96 pocillos.
- 17.- Realizar una recta de calibrado con patrones de rojo de alizarina. Para ello diluir la solución de rojo de alizarina en tampón ARS 1x del kit a una concentración final de 2 mM y realizar diluciones seriadas 1:2 hasta una concentración final de 15 µM.
- 18.- Poner 150 µl de cada patrón en la placa de 96 pocillos y medir la absorbancia a 405 nm. Extrapolar los datos de la muestra problema y obtener así la concentración de alizarina.

## 2. Tinción con *Oil Red O*.

La tinción con oil red se utilizó para identificar los depósitos de lípidos en cultivos derivados de células h\_ASC que aparecen durante el protocolo de adipogénesis. Además de su detección visual, también se puede cuantificar extrayendo el tinte unido a las vesículas lipídicas y midiendo su densidad óptica a 520 nm en un espectrofotómetro. Para ello se utilizó el kit Adipogénesis Assay de Chemicon (Millipore, Billerica, MA, USA) y la detección colorimétrica se realizó en un lector de placas µQuant Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), siguiendo los pasos siguientes:

- 1.- Aspirar el medio con cuidado de no levantar las células.
- 2.- Lavar una vez con PBS durante 2-3 min.
- 3.- Fijar las células con solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente.
- 4.- Eliminar el fijador y lavar con agua destilada, realizar 3 lavados de 10 min.
- 5.- Teñir con 300 µl de oil red durante 50 min a temperatura ambiente.



- 6.- Eliminar la solución de oil red y lavar con agua destilada, realizar 3 lavados de 10 min cada uno.
- 7.- Después del último lavado añadir agua destilada para evitar que las células se sequen. Observar al microscopio y fotografiar. Las células diferenciadas que contengan vesículas lipídicas se habrán teñido de rojo muy intenso.
- 8.- Añadir 200  $\mu$ l de solución de extracción del kit para extraer el tinte de las células y proceder a su cuantificación.
- 9.- Dejar en agitación fuerte durante 20 min.
- 10.- Transferir los 200  $\mu$ l a una placa de 96 pocillos y medir la absorbancia a 520 nm.



#### IV. INMUNOFLUORESCENCIA.

##### 1. Inmunofluorescencia de colágeno tipo I.

La detección de colágeno tipo I se realizó en células h\_ASC diferenciadas cultivadas sobre placas de poliestireno según el siguiente protocolo:

- 1.- Retirar el medio de cultivo y realizar 2 lavados de 2 min con PBS.
- 2.- Fijar las células durante 10 min con metanol 100% (Baker, Deventer, Holanda) frío a -20° C.
- 3.- Realizar 3 lavados de 2 min con PBS en agitación.
- 4.- Permeabilizar las células durante 15 min con 0,1 % de tritón en PBS en agitación.
- 5.- Realizar 3 lavados de 5 min con PBS en agitación.
- 6.- Incubar a temperatura ambiente durante 1 h con el anticuerpo primario para colágeno tipo I (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a una dilución 1:1000 en PBS suplementado con 1% de BSA y 1% de suero de cabra (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- 7.- Realizar 3 lavados de 5 min con PBS en agitación.
- 8.- Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón unido a Cy3 (Jackson, Bar Harbor, Maine, USA) a una dilución 1:500 suplementado con 1% de BSA y 1% de suero de cabra.
- 9.- Realizar 2 lavados de 10 min con PBS en agitación y oscuridad.
- 10.- Incubar durante 2 min en oscuridad con 50 µg/µl de Hoestch 33258 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en PBS.
- 11.- Realizar 2 lavados de 2 min en oscuridad y cubrir las células con PBS.
- 12.- Visualizar en el microscopio de fluorescencia (Olympus AX70, PA, USA).

## 2. Inmunofluorescencia de marcadores neuronales.

La detección de proteínas de linaje neuronal se realizó en los clones de células h\_ASC sembradas sobre cubres de vidrio tratados con gelatina 0,2% en PBS, según el protocolo de diferenciación neuronal. Transcurridas 72 h desde el inicio de la diferenciación, se procedió según el siguiente protocolo:

- 1.- Eliminar el medio y realizar 2 lavados de 5 min con PBS en agitación suave.
- 2.- Fijar las células con PFA al 4% (Panreac, Barcelona, España) durante 16 h a 4° C ó 20 min a temperatura ambiente.
- 3.- Retirar el fijador y realizar 2 lavados de 5 min con PBS en agitación.
- 4.- Permeabilizar con Tritón al 0,05% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en PBS durante 6 h a 4° C.
- 5.- Realizar 2 lavados de 5 min con PBS en agitación.
- 6.- Bloquear con 10% suero y 3 % de BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en PBS durante 1 h a 4° C o toda la noche a 4° C.
- 7.- Realizar 3 lavados de 5 min con PBS en agitación.
- 8.- Incubar 16 h a 4° C ó 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, diluido en PBS según la tabla 11.
- 9.- Realizar 3 lavados de 5 min con PBS en agitación.
- 10.- Incubar durante 30 min en oscuridad con el anticuerpo secundario, diluido en PBS según la tabla 12.
- 11.- Realizar 3 lavados de 5 min con PBS en oscuridad y agitación.
- 12.- Incubar con 1mg/ml de Hoescht 33258 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 3 min en oscuridad.
- 13.- Realizar 3 lavados de 5 min con PBS en oscuridad y agitación.
- 14.- Montar sobre portaobjetos con el kit Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA) para preservar la fluorescencia y guardar a -80° C hasta su visualización.

Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus AX70, PA, USA) y las imágenes se adquirieron con el software DP-SOFT 3.2 (Olympus, PA, USA).

Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados.

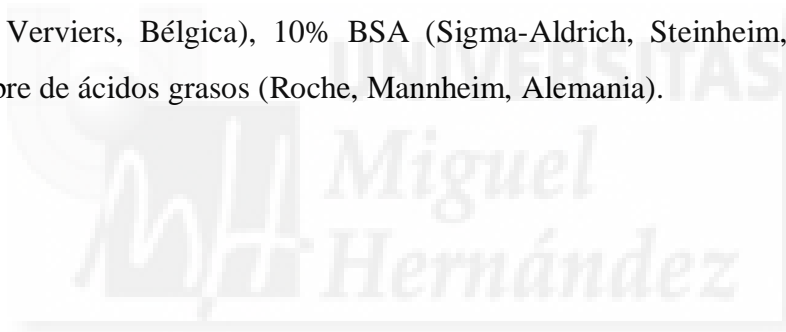
<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Animal inmunizado</b>	<b>Dilución de trabajo</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>GFAP</b>	Ratón	1:200	Becton-Dickinson
<b>NF-H</b>	Conejo	1:200	Sigma
<b>NF-M</b>	Pollo	1:500	Stemcell

Tabla 12. Anticuerpos secundarios utilizados.

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Dilución de trabajo</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Anti Ig-G ratón</b>	Cy3	1:1000	Jackson
<b>Anti Ig-G conejo</b>	Cy3	1:1000	Becton-Dickinson
<b>Anti Ig-Y pollo</b>	FITC	1:500	Abcam

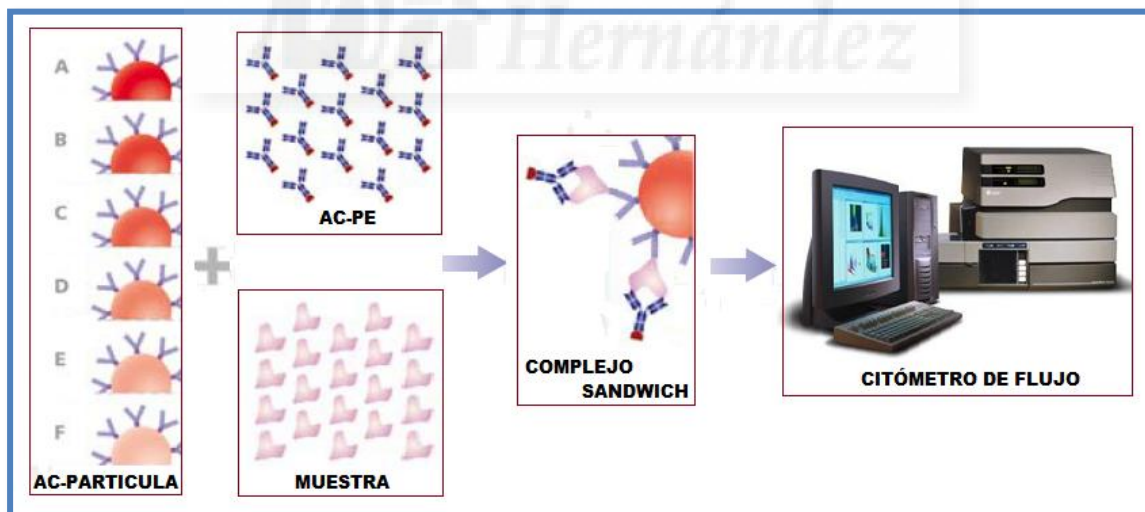
## V. REGISTRO INTRACELULAR DE CALCIO.

Los registros de calcio se hicieron en los clones de células h\_ASC después de 72 h en cultivo con medio de diferenciación neuronal o con medio de cultivo mesenquimal como control. Las células se cargaron con la sonda fluorescente sensible a calcio Fura-2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 1 h a 37° C. Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo 60x de inmersión de un microscopio invertido de epifluorescencia (Zeiss, Axiovert 200) cada 5 s con una cámara digital Hamamatsu C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Barcelona, España) usando un doble filtro de 340 y 380 nm (Sutter Instrument CO, CA, USA). Los datos fueron adquiridos con el software ORCA de Hamamatsu. Los cambios de fluorescencia se expresaron como el ratio entre la fluorescencia a 340 nm y 380 nm (F340/F380). El medio de perfusión contenía: 140 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Hepes, 2,5mM CaCl<sub>2</sub> y 3 mM glucosa, a pH=7,4. Los estímulos fueron 50 mM KCl, 10% FBS (Biowhittacker, Cambrex BioScience, Verviers, Bélgica), 10% BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) o 10% BSA libre de ácidos grasos (Roche, Mannheim, Alemania).



## VI. SECRECIÓN DE CITOCINAS.

Las citocinas secretadas por las poblaciones clonales de células h\_ASC se analizaron mediante sistemas CBA (Cytometric Bead Array) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), una técnica que combina el inmunoensayo y la citometría de flujo. Estos sistemas emplean una serie de partículas con distinta intensidad de fluorescencia, que a su vez van unidas a anticuerpos específicos para cada citocina a analizar, representando una población concreta con una intensidad de fluorescencia determinada. Este complejo anticuerpo-partícula se puede unir a la citocina correspondiente presente en la muestra, permitiendo así detectar simultáneamente varias citocinas en muy poco tiempo (comparado con un ELISA convencional). La citocina presente en la muestra, que se une al complejo Ac-partícula, es detectada por medio de un inmunoensayo directo utilizando anticuerpos unidos a ficoeritrina (Ac-PE). Así pues, el complejo tipo sándwich formado por la muestra incubada con la mezcla de Ac-partícula y Ac-PE, es analizado mediante citometría de flujo permitiendo así su detección y cuantificación (Esquema 6).



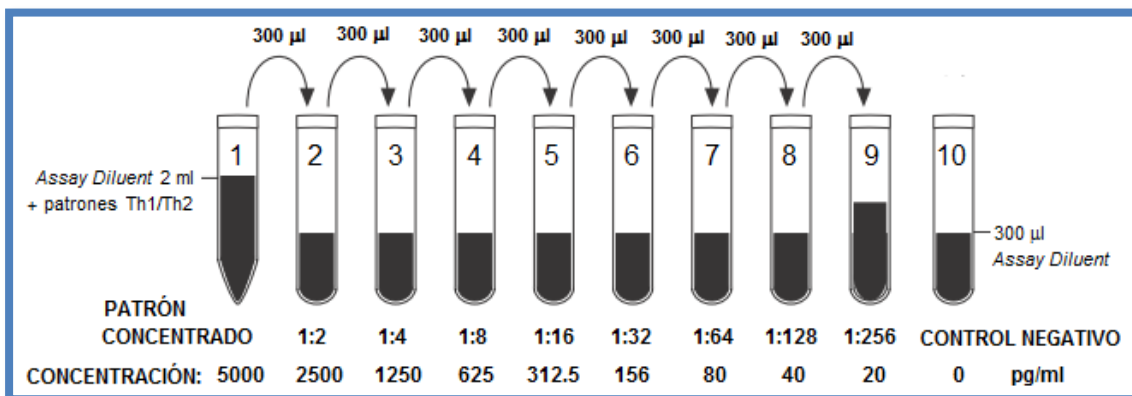
Esquema 6. Sistema CBA con 6 partículas de distinta intensidad de fluorescencia para analizar simultáneamente múltiples analitos en una misma muestra por citometría de flujo.

## 1. Cuantificación de citocinas Th1/Th2.

La detección y cuantificación de citocinas secretadas por distintos clones de células h\_ASC, se realizó siguiendo las instrucciones del Kit Human Th1/Th2 Cytokine (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), el cual permite detectar simultáneamente hasta seis citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- $\gamma$ ) mediante citometría de flujo. Para ello las células se cultivaron en placas de 96 pocillos, sembrando 15.000 células por pocillo. A continuación se estimularon con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS (lipopolisacárido) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y se recogieron los sobrenadantes trascurridas 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h. Los sobrenadantes después de ser centrifugados, se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  para su posteriormente análisis, según el siguiente protocolo:

### A) Preparación de los patrones para la curva de calibración:

- 1.- Abrir un vial de los patrones Th1/Th2 liofilizado y transferir su contenido a un tubo de fondo cónico de 15 ml. Rotular como tubo 1 (patrón concentrado).
- 2.- Reconstituir con 2 ml de *Assay Diluent* y mantener 15 min a temperatura ambiente, mezclando suavemente de vez en cuando.
- 3.- Preparar 9 tubos más para hacer las diluciones añadiendo 300  $\mu\text{l}$  de *Assay Diluent* en cada uno.
- 4.- Realizar diluciones seriadas 1:2 añadiendo 300  $\mu\text{l}$  del tubo 1 al tubo 2 y así sucesivamente hasta el tubo 9, dejando el último tubo sólo con *Assay Diluent* para utilizarlo como control negativo (Esquema 7). Mezclar las diluciones suavemente con la pipeta.



Esquema 7. Preparación de los patrones de citocinas Th1/Th2 para la curva de calibración.

**B) Preparación de las bolas de captura:**

- 1.- Calcular el número de tubos en total que se van a analizar en el experimento, incluyendo los patrones (por ejemplo, si se analizan 12 muestras junto con los 10 patrones, el total de tubos será de 22).
- 2.- Agitar vigorosamente con vortex los 6 viales de bolas de captura del kit.
- 3.- Preparar un tubo para la mezcla de las bolas de captura, añadiendo 10  $\mu$ l de cada uno de los 6 tipos de bolas de captura por cada tubo que va a ser analizado (por ejemplo, si se van a analizar un total de 22 tubos, se añadirán 220  $\mu$ l de cada uno de los 6 tipos).
- 4.- Mezclar con vortex y centrifugar a 200xg 5 min.
- 5.- Retirar con cuidado el sobrenadante y resuspender el precipitado con *Serum Enhancement Buffer* (añadir el mismo volumen que se ha retirado antes del sobrenadante).
- 6.- Mezclar con vortex y dejar incubar a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad.

**C) Preparación del ensayo:**

- 1.- En una placa de 96 pocillos, añadir al pocillo correspondiente:
  - 50  $\mu$ l de la mezcla de bolas de captura.
  - 50  $\mu$ l del anticuerpo de detección marcado con PE.
  - 50  $\mu$ l de los patrones diluidos.
  - 50  $\mu$ l de las muestras problema.
- 2.- Incubar 140 min a temperatura ambiente en oscuridad y agitación suave.
- 3.- Lavar añadiendo 50  $\mu$ l de *Wash Buffer* a los pocillos, mezclar y centrifugar a 200xg durante 3 min.
- 4.- Retirar el sobrenadante y volver a lavar añadiendo 200  $\mu$ l de *Wash Buffer*, mezclar y centrifugar a 200xg durante 3 min.
- 5.- Retirar el sobrenadante y añadir 200  $\mu$ l de *Wash Buffer*.
- 6.- Pasar el contenido de cada pocillo a tubos de adquisición para ser analizados en el citómetro de flujo.



**D) Calibración específica del citómetro para CBA:**

- 1.- Rotular 3 tubos como A, B y C. Añadir:
  - 50 µl de *Cytometer Setup Beads* a los 3 tubos.
  - 50 µl de *FITC Positive Control Detector* al tubo B.
  - 50 µl de *PE Positive Control Detector* al tubo C.
- 2.- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- 3.- Añadir 450 µl de *Wash Buffer* al tubo A y 400 µl a los tubos B y C.
- 4.- Leer en el citómetro y calibrar como especifica el protocolo del kit.

Finalmente, todos los tubos preparados en el paso C son analizados en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA) con el software FacsComp.

**2. Cuantificación de citocinas inflamatorias.**

La detección y cuantificación de citocinas secretadas por distintos clones de células h\_ASC, se realizó siguiendo las instrucciones del Kit Human Inflammation (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), el cual permite detectar simultáneamente hasta seis citocinas (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12) mediante citometría de flujo. Para ello las células se cultivaron en placas de 96 pocillos, sembrando 15.000 células por pocillo. Se dejaron 4 días en cultivo y a continuación se estimularon con 0,2 µg/ml de LPS y con 24 ng/ml de PMA más 1 µg/ml de Ionomicina, todos de la casa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los sobrenadantes se recogieron trascurridas 0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h, se centrifugaron y congelaron a -20° C. Posteriormente se analizaron según las instrucciones del fabricante, siguiendo un protocolo similar al anterior:

**A) Preparación de los patrones para la curva de calibración:**

- 1.- Abrir un vial de los patrones liofilizados y transferir su contenido a un tubo de fondo cónico de 15 ml. Rotular como tubo 1 (patrón concentrado).
- 2.- Reconstituir con 2 ml de *Assay Diluent* y mantener 15 min a temperatura ambiente, mezclando suavemente de vez en cuando.

- 3.- Preparar 9 tubos más para hacer las diluciones de los patrones añadiendo 300  $\mu$ l de *Assay Diluent* a cada uno.
- 4.- Realizar diluciones seriadas 1:2 añadiendo 300  $\mu$ l del tubo 1 al tubo 2 y así sucesivamente hasta el tubo 9, dejando el último tubo sólo con *Assay Diluent* para utilizarlo como control negativo (Esquema 7). Mezclar las diluciones suavemente con la pipeta.

#### B) Preparación de las bolas de captura:

- 1.- Calcular el número de tubos en total que se van a analizar en el experimento, incluyendo los patrones (por ejemplo, si se analizan 12 muestras junto con los 10 patrones, el total de tubos será de 22).
- 2.- Agitar vigorosamente con vortex los 6 viales de bolas de captura del kit.
- 3.- Preparar un tubo para la mezcla de las bolas de captura, añadiendo 10  $\mu$ l de cada uno de los 6 tipos de bolas de captura por cada tubo que va a ser analizado (por ejemplo, si se van a analizar un total de 22 tubos, se añadirán 220  $\mu$ l de cada uno de los 6 tipos).
- 4.- Mezclar con vortex y centrifugar 200xg 5 min.
- 5.- Retirar con cuidado el sobrenadante y resuspender el precipitado en *Serum Enhancement Buffer* (añadir el mismo volumen que se ha retirado antes del sobrenadante).
- 6.- Mezclar con vortex y dejar incubar a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad.

#### C) Preparación del ensayo:

- 1.- En una placa de 96 pocillos, añadir al pocillo correspondiente:
  - 50  $\mu$ l de la mezcla de bolas de captura.
  - 50  $\mu$ l de los patrones diluidos.
  - 50  $\mu$ l de las muestras problema.
- 2.- Incubar 60 min a temperatura ambiente en oscuridad y agitación suave.
- 3.- Lavar añadiendo 100 $\mu$ l de *Wash Buffer* a los pocillos, mezclar y centrifugar a 200xg durante 5 min.

- 4.- Retirar el sobrenadante y volver a lavar añadiendo 200  $\mu$ l de *Wash Buffer*, mezclar y centrifugar a 200xg durante 5 min. Retirar el sobrenadante.
- 5.- Añadir 100  $\mu$ l de *Wash Buffer* y 50  $\mu$ l del anticuerpo de detección marcado con PE.
- 6.- Incubar 60 min a temperatura ambiente en oscuridad y agitación suave.
- 7.- Lavar añadiendo 50 $\mu$ l de *Wash Buffer* a los pocillos, mezclar y centrifugar a 200xg durante 5 min.
- 8.- Retirar el sobrenadante y volver a lavar añadiendo 200  $\mu$ l de *Wash Buffer*, mezclar y centrifugar a 200xg durante 5 min.
- 9.- Retirar el sobrenadante, añadir 200  $\mu$ l de *Wash Buffer* y pasar el contenido de cada pocillo a tubos de adquisición para ser analizados en el citómetro de flujo.

D) Calibración específica del citómetro para CBA:

- 1.- Rotular 3 tubos como A, B y C. Añadir:
  - 50  $\mu$ l de *Cytometer Setup Beads* a los 3 tubos.
  - 50  $\mu$ l de *FITC Positive Control Detector* al tubo B.
  - 50  $\mu$ l de *PE Positive Control Detector* al tubo C.
- 2.- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- 3.- Añadir 450  $\mu$ l de *Wash Buffer* al tubo A y 400  $\mu$ l a los tubos B y C.
- 4.- Leer en el citómetro y calibrar como especifica el protocolo del kit.

Finalmente, todos los tubos preparados en el paso C son analizados en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA) con el software FacsComp.

**VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Todos los datos han sido analizados por duplicado y representados como las medias  $\pm$  la desviación estándar. Se ha realizado también análisis estadístico comparativo mediante el test de t de Student, considerando significativas las diferencias con  $p < 0,05$ .





*RESULTADOS*

## 1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO Y SELECCIÓN CLONAL.

Se han aislado poblaciones de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo obtenido mediante procedimientos de liposucción de tres donantes voluntarias (h\_ASC 1, h\_ASC 2 y h\_ASC 3) de sexo femenino y de edades comprendidas entre los 25 y 35 años. Las poblaciones han sido aisladas según el protocolo descrito por Zuk y colaboradores en 2001, a través de una digestión enzimática con colagenasa, seguida de una centrifugación y siembra del precipitado celular obtenido. Durante los primeros días de cultivo de estas poblaciones recién aisladas, se realizaron varios lavados con PBS para ir eliminando las células que no tenían capacidad de adhesión al plástico. Finalmente y tras varias tripsinizaciones, las poblaciones adquirieron una apariencia más uniforme, mostrando todas una morfología fusiforme típica (Figura 1).

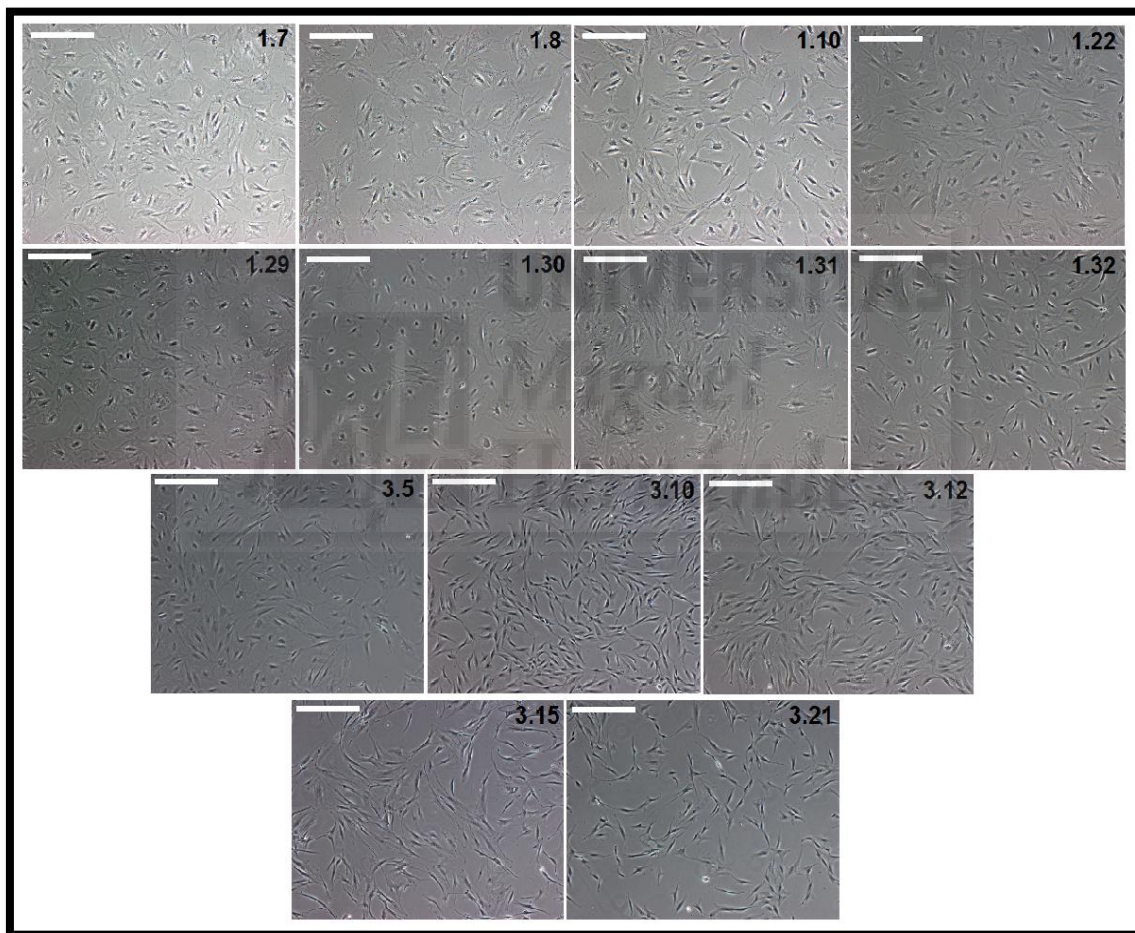


*Figura 1. Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases de las distintas poblaciones de células madre mesenquimales aisladas de tejido adiposo. Barra 200  $\mu$ m. Aumentos 4x.*

Debido a que estas poblaciones son aisladas gracias a su capacidad de adherencia al plástico, no se puede descartar la presencia de otros tipos celulares en ellas, por lo que en estos cultivos es posible observar cierta heterogeneidad celular. Para conseguir poblaciones celulares homogéneas y asegurar la reproducibilidad de los experimentos posteriores, se obtuvieron poblaciones clonales derivadas de una única célula. Del primer donante (población h\_ASC 1) se aislaron 8 clones procedentes de un pase 6, denominados 1.7, 1.8, 1.10, 1.22, 1.29, 1.30, 1.31 y 1.32. Del tercer donante (población h\_ASC 3) se aislaron 5 clones procedentes de un pase 2, denominados 3.5,

3.10, 3.12, 3.15 y 3.21. Mientras que del segundo donante (h\_ASC 2) no se consiguió aislar ningún clon después de varios intentos.

Todos los clones aislados muestran una morfología típica mesenquimal (Figura 2) y pueden mantenerse en cultivo por largos periodos de tiempo. Mantuvieron constantes sus tasas de crecimiento, tripsinizándose cada 10-15 días según el clon y no mostraron signos de senescencia, manteniendo constante su viabilidad durante los sucesivos pases.

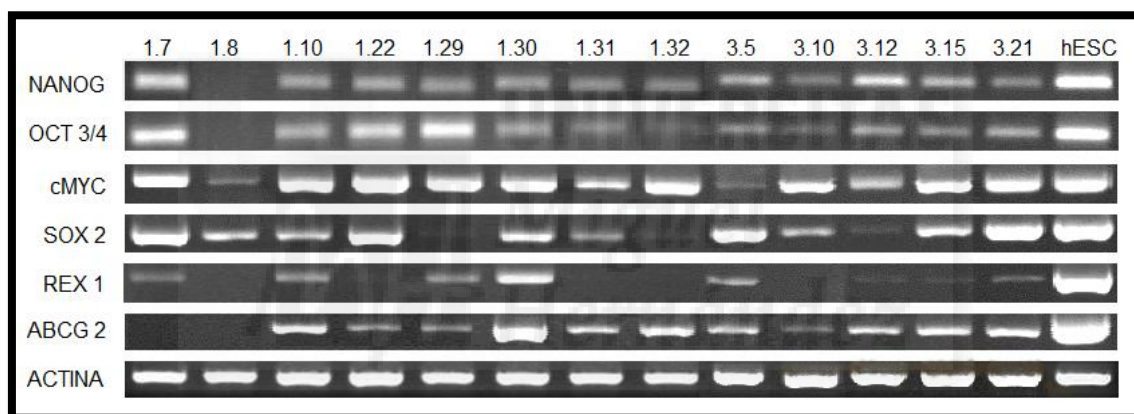


**Figura 2. Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases de las poblaciones clonales de células madre mesenquimales aisladas de tejido adiposo. Barra 200  $\mu$ m. Aumentos 4x.**



## 2. CARACTERIZACIÓN GÉNICA DE POBLACIONES CLONALES DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO.

En primer lugar se procedió a estudiar la expresión génica por RT-PCR de marcadores típicos de pluripotencialidad o estado indiferenciado, utilizando como control positivo células madre embrionarias humanas VAL7. Se observó que todos los clones muestran expresión positiva para varios de los genes analizados (Figura 3), siendo el clon 1.8 el que únicamente expresa señal para c-myc y sox2. Por ello, a priori, se podría considerar este clon 1.8 como el que menos potencial tendría para diferenciar a distintos linajes.



**Figura 3.** Perfil de expresión génica de diferentes marcadores de pluripotencialidad por RT-PCR de los distintos clones aislados y cultivados en condiciones normales para h\_ASC, incluyendo células madre embrionarias humanas (hESC) como control positivo.

Con la idea de verificar si estos patrones de expresión génica se corresponden con la potencialidad de los diversos clones a diferenciar a distintos linajes, se procedió a realizar diversas pruebas fenotípicas y funcionales, estudiando también los niveles de expresión de genes característicos de dichos linajes antes y después de inducir la diferenciación.



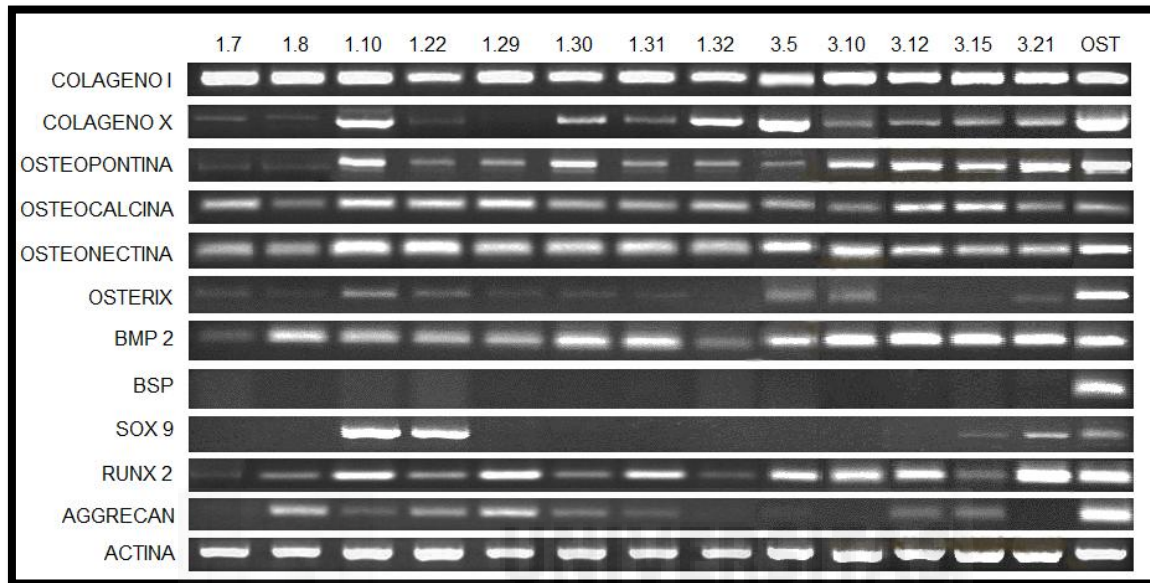
### **3. ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN HACIA DISTINTOS TIPOS CELULARES DE POBLACIONES CLONALES DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSEO.**

Las células madre mesenquimales, ya sean de médula ósea o de tejido adiposo, se caracterizan por ser capaces de diferenciar a multitud de tipos celulares de diferente linaje bajo las condiciones de cultivo adecuadas. Principalmente y debido a su origen mesodérmico, estas células presentan una alta capacidad de diferenciación hacia osteocitos, adipocitos y condrocitos, estando muy bien definidos dichos protocolos de cultivo. Puesto que las poblaciones de células madre de tejido adiposo inicialmente aisladas son un cultivo heterogéneo donde podrían encontrarse células madre o progenitores más o menos comprometidos, es posible pensar que las poblaciones clonales aisladas puedan diferir en su capacidad para diferenciar a distintos tipos celulares, ya que podrían derivar de progenitores con distinto grado de potencialidad.

#### **3.1. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.**

Antes de someter a los clones aislados a distintos procesos de diferenciación, se estudió su expresión génica por RT-PCR de marcadores típicos de hueso y cartílago, utilizando osteoblastos humanos como control positivo. Han sido caracterizados más de 20 formas distintas de colágeno, pero el colágeno tipo I es el que constituye cerca del 90% del tejido óseo. Todos los clones aislados presentan altos niveles de expresión de colágeno tipo I, mientras que de colágeno tipo X, característico de cartílago hipertrófico, presentan mayor variabilidad en la expresión (Figura 4). Además han sido estudiados otros genes característicos de linaje osteogénico y condrogénico, observándose también distintos patrones de expresión en este estado basal (en condiciones de cultivo normales). Comparado con el perfil de expresión que muestran los osteoblastos humanos, parece que los clones con un perfil más parecido y que en teoría deberían mostrar mayor plasticidad para diferenciar a hueso son el 1.10, que expresa todos los genes a excepción de BSP que no se detecta en ningún clon, y el 1.22, aunque la señal de colágeno X es más baja que la de los osteoblastos. Por el contrario, los clones 1.7 y 1.8 poseen un perfil de expresión que difiere mucho más al que

presentan los osteoblastos humanos, sobre todo el 1.7 que muestra baja expresión en la mayoría de los genes analizados.



**Figura 4.** Perfil de expresión génica de diferentes marcadores de hueso y cartílago por RT-PCR de los distintos clones aislados y cultivados en condiciones normales para h\_ASC, incluyendo osteoblastos humanos (OST) como control positivo.

Estos niveles de expresión han sido cuantificados por RT-PCR a tiempo real para genes característicos de linaje osteogénico como runx2, osteonectina, fosfatasa alcalina y osteocalcina. Se ha observado que para osteocalcina todos los clones tienen un nivel de expresión basal mucho más bajo que los osteoblastos humanos, mientras que para los otros tres genes son mucho más variables dependiendo del clon (Figura 5). Por lo tanto, no existe ningún clon que presente los mismos niveles de expresión que los osteoblastos humanos para estos cuatro genes analizados, por lo que esta comparación entre los distintos clones y los osteoblastos humanos no aporta información suficiente para ser utilizada en la identificación de aquellos clones con mayor potencial de diferenciación a este linaje.

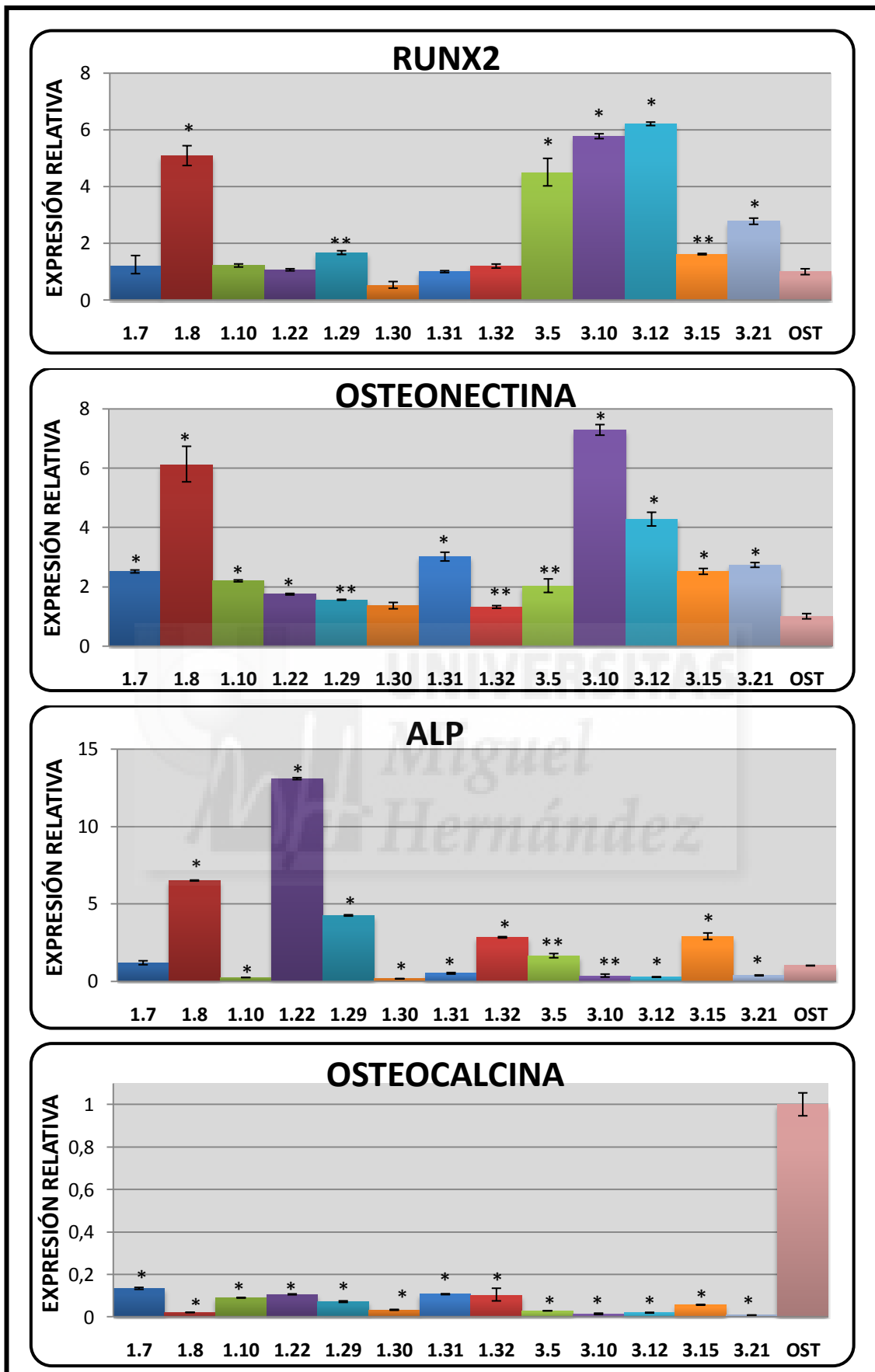
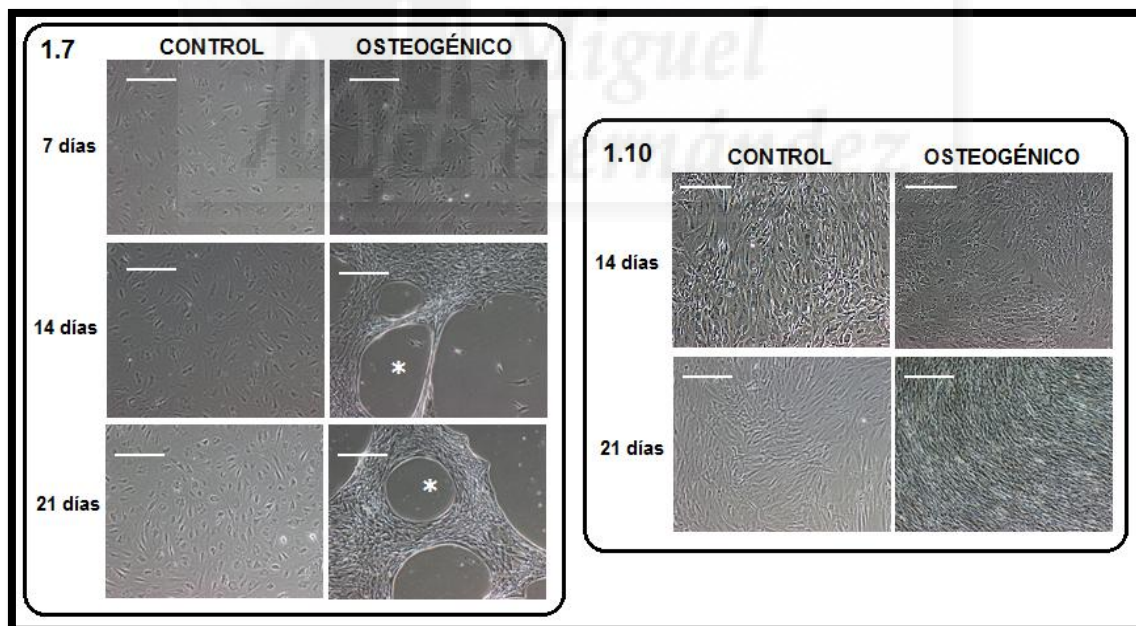


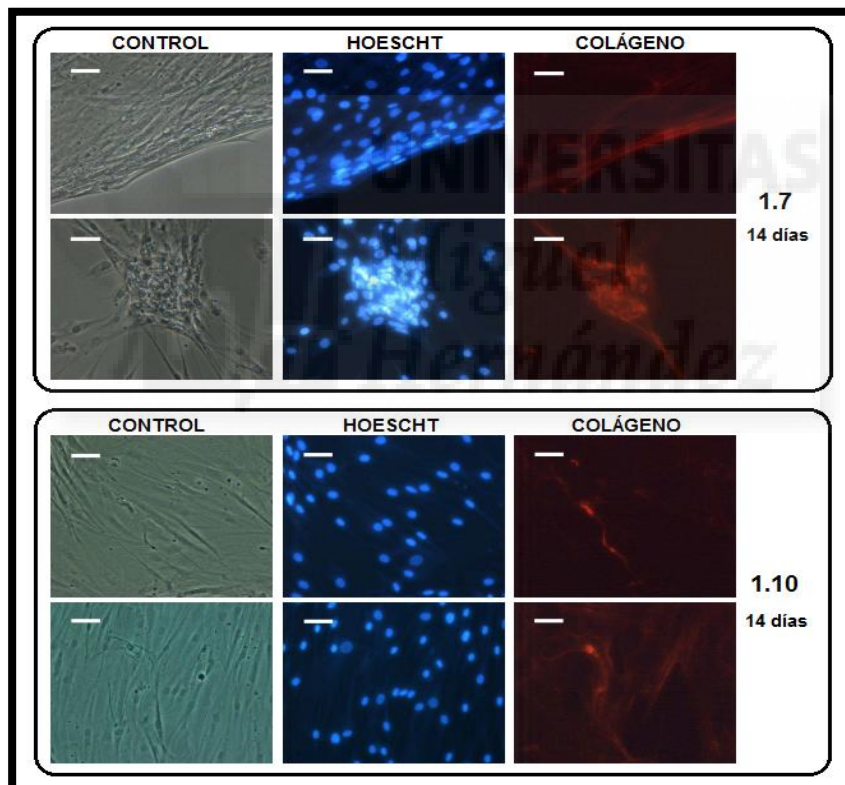
Figura 5. Análisis de la expresión relativa de runx2, osteonectina, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina cuantificada por RT-PCR a tiempo real de los clones aislados y cultivados en condiciones normales para h\_ASC. Datos representados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=2). Significación estadística realizada mediante el test t de Student, comparando cada clon con los osteoblastos humanos: \*p<0,01; \*\*p<0,05.

La capacidad de diferenciación osteogénica se analizó en todos los clones por duplicado y utilizando siempre pases inferiores al 12. Las células se sembraron en placas de cultivo de 60 mm Ø y la diferenciación se inició una vez alcanzado el 100% de confluencia, manteniendo siempre una placa como control con medio de cultivo mesenquimal sin suplementar con dexametasona, ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato. La inducción se finalizó a los 25 días, con cambios regulares de medio cada 3-4 días. Durante la diferenciación se observaron cambios fenotípicos en ciertos clones una vez pasadas 2 semanas desde su inicio. El cambio más significativo fue la aparición de calvas o huecos en muchas de las monocapas, resultado del crecimiento y reagrupamiento de las células en pequeños agregados, formando unas lagunas características, como se observa por ejemplo en el clon 1.7 (Figura 6). Por el contrario, algunos clones permanecían sin grandes cambios, presentando una monocapa celular sin alteraciones, como muestra por ejemplo el clon 1.10.



**Figura 6.** Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases de fases de los clones 1.7 y 1.10 cultivados durante los días indicados en medio control y medio osteogénico. Los asteriscos muestran las lagunas sin células que se forman durante la diferenciación osteogénica. Aumentos 4x. Barra 200  $\mu$ m.

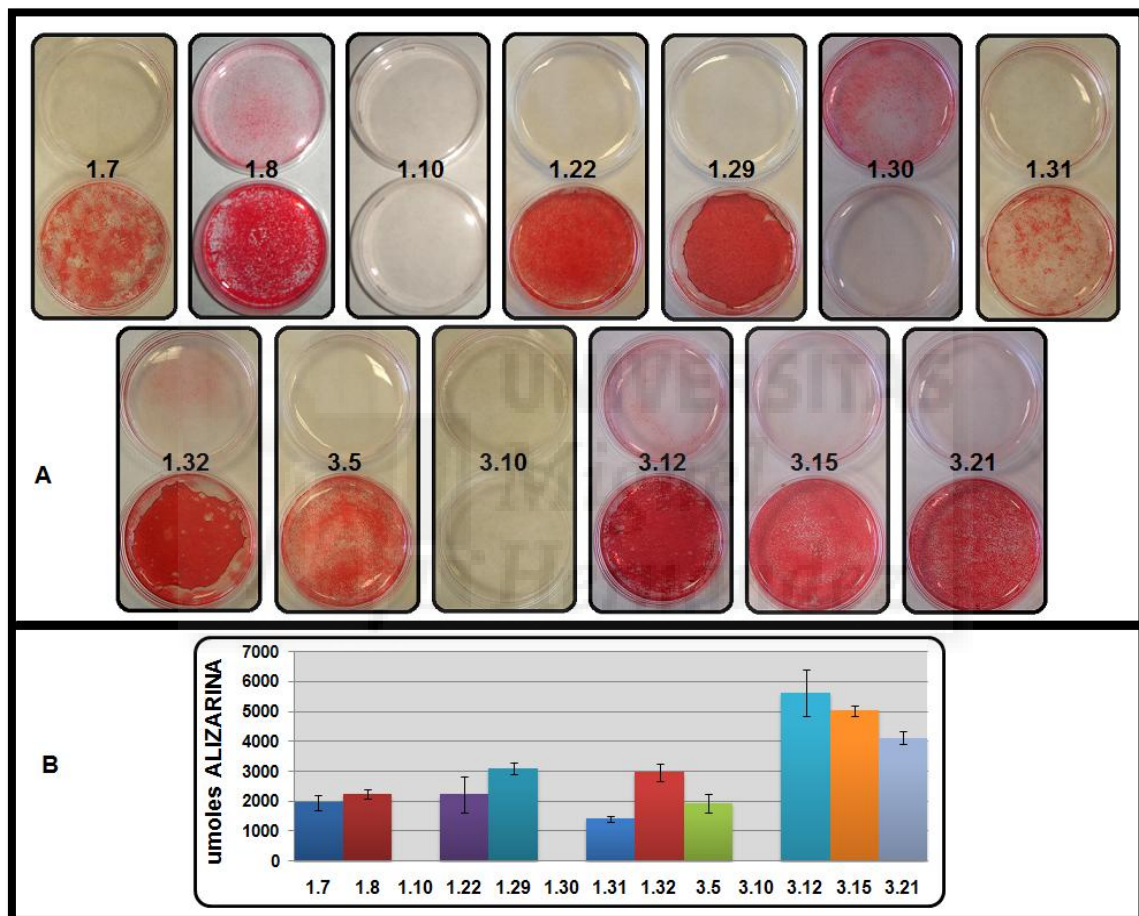
Estas diferencias fenotípicas observadas, se reflejaron también en el patrón de disposición del colágeno tipo I. A pesar de ser expresado en todos los clones de forma robusta, su disposición en el cultivo es muy diferente según el clon forme estructuras lacunares o no. Mediante técnicas de inmunofluorescencia se pudo observar, ya a las 2 semanas de diferenciación, como el colágeno se dispone formando unas fibras paralelas alrededor de estas estructuras lacunares, mientras que en los clones que no se forman estas estructuras la disposición de colágeno es más dispersa y aleatoria por todo el cultivo (Figura 7). En ambos casos, la expresión de colágeno tipo I sigue aumentando durante todo el periodo de diferenciación, pero manteniendo dicha distribución inicial.



**Figura 7.** Imagen de los patrones de disposición de colágeno en los clones 1.7 y 1.10. A la derecha en rojo imágenes de inmunofluorescencia de colágeno tipo I, en el centro en azul tinción de los núcleos con Hoescht y a la izquierda imágenes de contraste de fases. Aumentos 40x. Barra 200 µm.

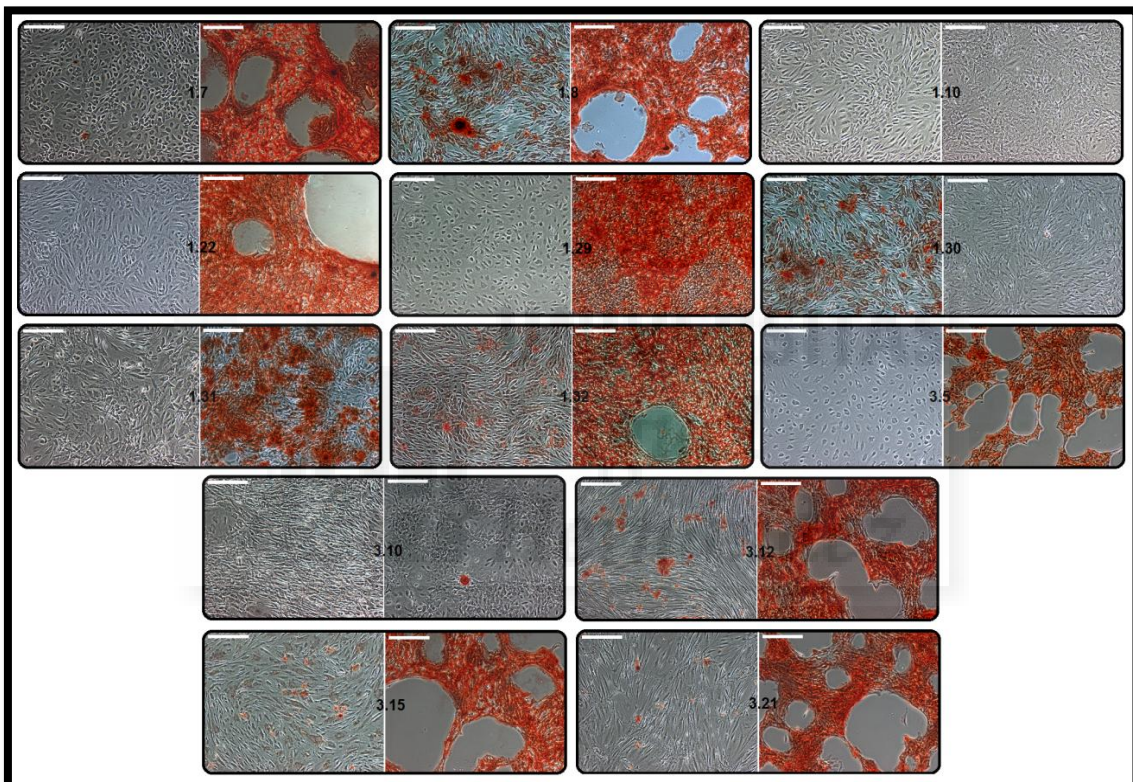


Una vez finalizada la inducción osteogénica en todos los clones, se analizó mediante tinción con alizarina los depósitos de fosfato de calcio formados durante los procesos de mineralización, originados como resultado de una diferenciación positiva. Como se muestra en la Figura 8, sólo 3 clones de los 13 estudiados no diferencian hacia linaje osteogénico (1.10, 1.30 y 3.10), ya que son negativos para la tinción con alizarina.



**Figura 8. A)** Fotografía de las placas de cultivo de los clones cultivados durante 25 días en condiciones de cultivo control (placa superior) y en presencia de medio osteogénico (placa inferior) después de teñir con alizarina. **B)** Gráfica de la cuantificación por colorimetría de la tinción de alizarina una vez finalizada la diferenciación osteogénica. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=2$ ).

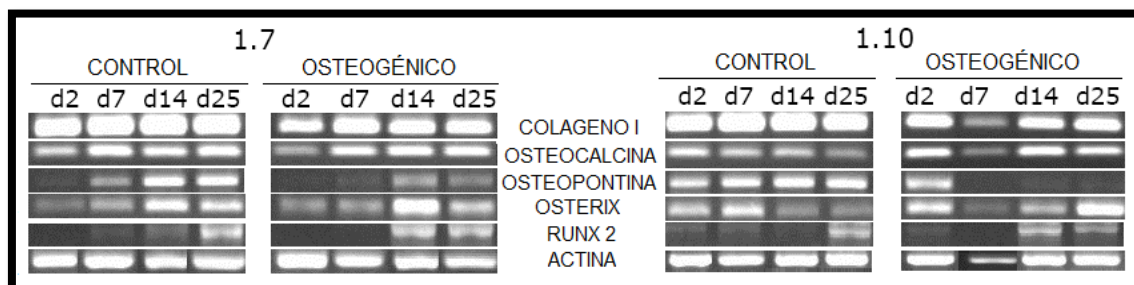
En más detalle, como se observa en la Figura 9, los clones que son positivos a alizarina suelen formar numerosas y grandes lagunas cuando se induce la diferenciación osteogénica, excepto los clones 1.29 y 1.31 que forman menos lagunas y más pequeñas. A pesar de ello, podemos decir que la formación de estas estructuras durante la diferenciación osteogénica en poblaciones de h\_ASC es un signo indicativo de una diferenciación positiva hacia este linaje.



**Figura 9. Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases de los clones cultivados durante 25 días en condiciones de cultivo control (izquierda del clon) y en presencia de medio osteogénico (derecha del clon) después de realizar la tinción con alizarina. Barra 200  $\mu\text{m}$ . Aumentos 4x.**

En ocasiones también podemos encontrar pequeños nódulos de mineralización en las placas control, como por ejemplo en los clones 1.8, 1.30, 1.32 y 3.12. Este hecho es consecuencia del mantenimiento de las células durante todo el proceso de diferenciación (25 días) en la misma placa de cultivo sin tripsinizar, que unido al

aumento en la expresión génica de ciertos marcadores osteogénicos durante este periodo (Figura 10), podría conducir en ciertos cultivos a una acumulación de depósitos minerales en estas condiciones control.



**Figura 10.** Expresión génica por RT-PCR de diferentes genes osteogénicos para los clones 1.7 y 1.10 cultivados en condiciones control y en presencia de medio osteogénico durante los días indicados.

Analizando en más detalle la variación de la expresión génica durante los 25 días de diferenciación, tanto en condiciones control como con medio osteogénico, existen leves diferencias para los genes analizados entre clones que sí diferencian como el 1.7 y los que no lo hacen como el 1.10. La diferencia más relevante la observamos en el gen de osteopontina que se expresa tempranamente en el clon 1.10 y se mantiene en condiciones control durante los 25 días. Sin embargo, durante la inducción osteogénica la expresión se ve reducida a partir de la primera semana de diferenciación. Por el contrario, el clon 1.7 inicialmente presenta niveles bajos de expresión y gradualmente va aumentando, tanto en condiciones control como con medio osteogénico. Para osterix, otro de los genes estudiados, parece que en el clon 1.7 su expresión aumenta a partir de las dos semanas de cultivo, tanto en condiciones control como en medio osteogénico. Sin embargo, la expresión en el clon 1.10 parece no seguir este mismo patrón. La expresión de runx2 para los dos clones y en ambas condiciones se ve incrementada después de las 2 semanas de inducción. Finalmente, no se observan diferencias apreciables entre los dos clones y en las distintas condiciones para los genes colágeno tipo I y osteocalcina, aunque todas estas conclusiones deberían asegurarse mediante RT-PCR a tiempo real.



Puesto que los análisis por RT-PCR convencional aparentemente no arrojan ningún resultado concluyente, se llevaron a cabo estudios de cuantificación de la expresión génica por RT-PCR a tiempo real, comparando los niveles de expresión en condiciones de cultivo basales (antes de iniciar la diferenciación) y una vez concluida la diferenciación osteogénica (Figura 11), con la finalidad de encontrar alguna diferencia característica que permita establecer los clones con más potencialidad a diferenciar hacia linaje osteogénico en base a los cambios en su perfil génico.

Analizando en detalle la Figura 11 y teniendo en cuenta que los clones que no diferencian hacia linaje osteogénico son el 1.10, 1.30 y 3.10, observamos que para el gen *runx2* todos los clones aumentan su expresión después de los 25 días de diferenciación. Sin embargo, para el gen *osteonectina* hay clones que tienen una expresión superior antes de iniciar su diferenciación, como por ejemplo el clon 3.10 que no diferencia, pero por el contrario, el clon 1.10 que tampoco diferencia tiene una expresión basal inferior y aumenta considerablemente transcurrido el periodo de inducción. Por lo que aunque estos clones fenotípicamente se comportan igual cuando se induce la diferenciación, a nivel de expresión génica son considerablemente distintos. Algo similar podemos observar en el caso de *osteocalcina*, donde hay clones que aumentan su expresión durante la inducción osteogénica (1.8 por ejemplo) y otros donde disminuye (como el 1.22). En cuanto a los clones que no diferencian, mientras el clon 1.10 disminuye su expresión, el 1.30 y 3.10 la mantienen más o menos igual. Finalmente, para el gen de *fosfatasa alcalina* podemos observar que la mayoría de los clones aumentan su expresión después de inducir la diferenciación (como el 1.22 y 1.30) o la mantienen igual (1.7 y 3.10 por ejemplo).

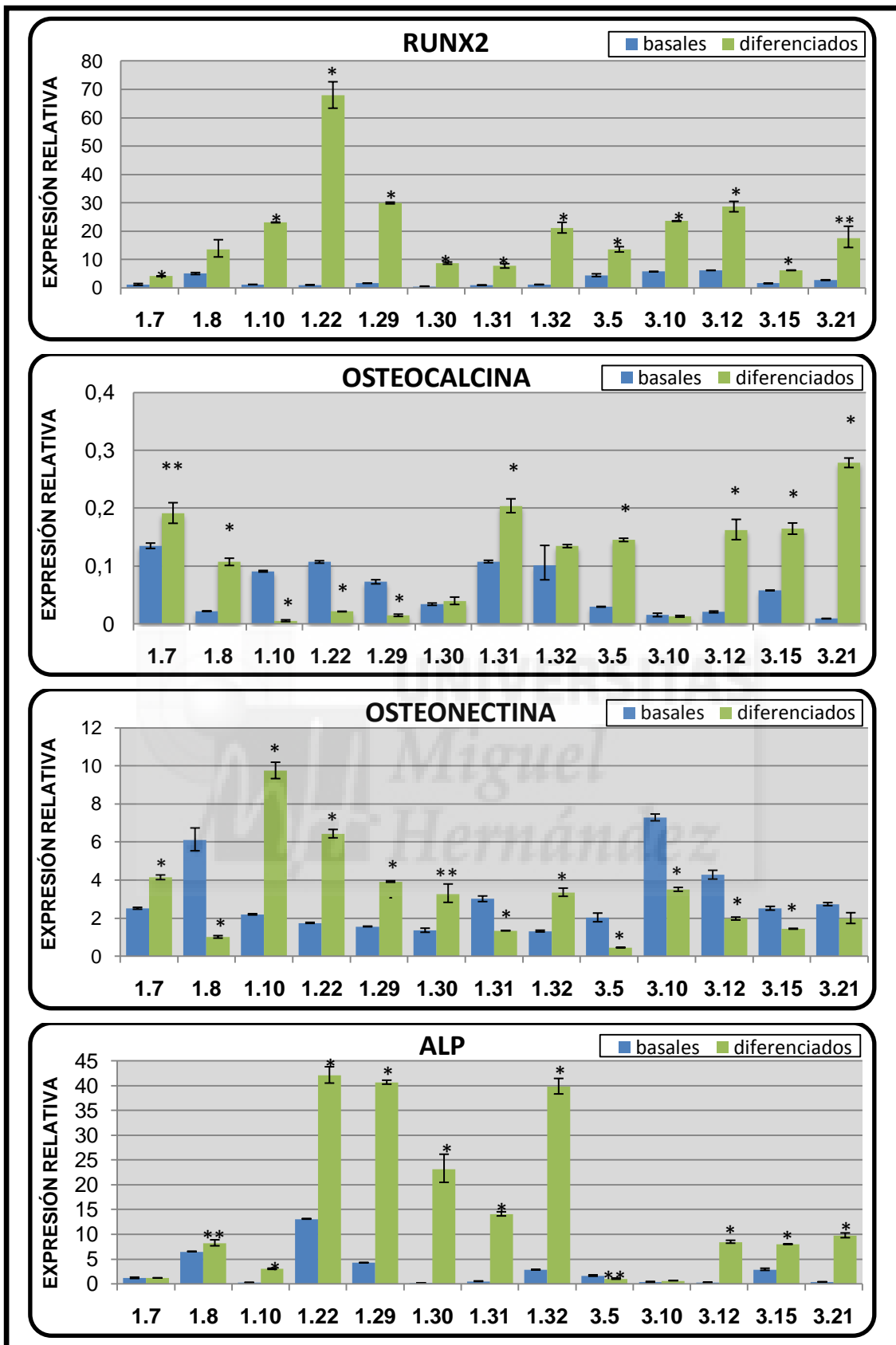


Figura 11. Análisis de la expresión relativa de *runx2*, osteocalcina, osteonectina y fosfatasa alcalina (ALP) cuantificada por RT-PCR a tiempo real de los clones cultivados en condiciones control (azul) y una vez finalizada la diferenciación osteogénica (verde). Datos representados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=2). Significación estadística realizada mediante el test t de Student, comparando en cada clon los niveles basales con los diferenciados: \*p<0,01; \*\*p<0,05.

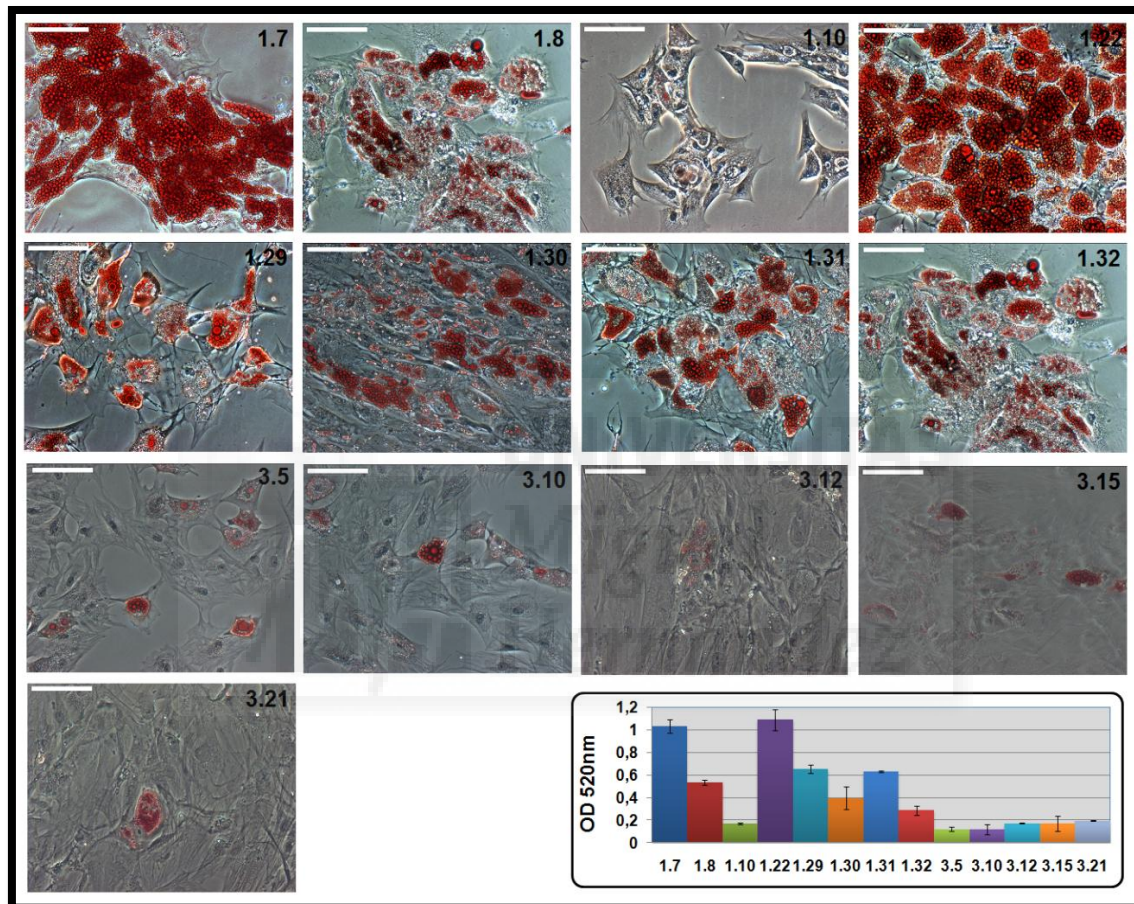
Sabiendo ahora cuales son los clones que no diferencian (1.10, 1.30 y 3.10) y retomando la figura 5, donde se cuantifica la expresión basal por RT-PCR a tiempo real de estos mismos genes, es difícil poder establecer alguna relación entre niveles de expresión génica y potencial de diferenciación hacia linaje osteogénico. Por ejemplo, podemos observar como el clon 1.8 con niveles altos de expresión para *runx2* y osteonectina sí diferencia, mientras el clon 3.10 que también posee niveles altos de expresión para estos genes no diferencia. De igual forma, el clon 1.7 y el 1.10 que al diferenciar se comportan de forma completamente distinta, presentan niveles similares de expresión para estos dos genes. En cuanto a fosfatasa alcalina, estos tres clones negativos a alizarina presentan niveles mínimos de expresión, pero los clones 1.31, 3.12 y 3.21 también tienen estos niveles y son positivos a dicha tinción.

Similares conclusiones se pueden tomar revisando las Figuras 3 y 4. Así pues, el clon 1.8 que expresa pocos marcadores de pluripotencialidad resulta que diferencia positivamente y el clon 1.10, que tiene un perfil de expresión génica similar a los osteoblastos humanos, no diferencia hacia este linaje.

### **3.2. DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA.**

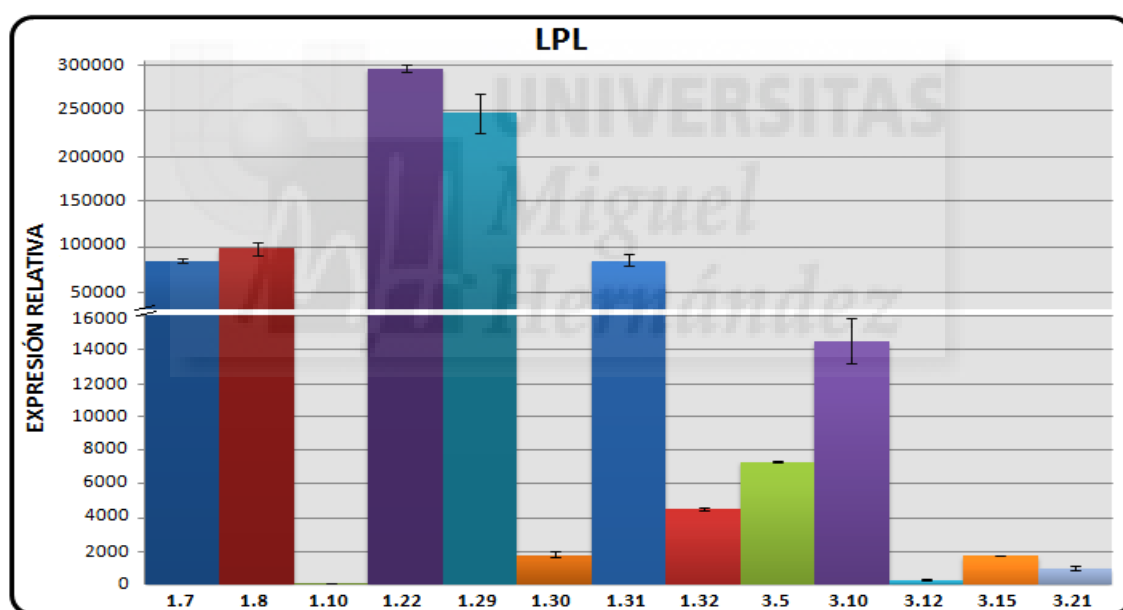
La capacidad de diferenciación adipogénica se analizó en todos los clones por duplicado y utilizando siempre pases inferiores al 12. Las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (25.000 cel/poc), manteniendo siempre un pocillo como control con medio de cultivo mesenquimal sin suplementar con IBMX, indometacina, dexametasona e insulina. La diferenciación se finalizó a los 21 días, con cambios regulares de medio cada 2-3 días. Durante este periodo se produjeron cambios fenotípicos en ciertos clones una vez transcurridos 10 días desde el inicio de la diferenciación, observándose la aparición de pequeñas vacuolas lipídicas en el interior celular que iban aumentando hasta el final de dicho proceso, mientras que los controles no mostraban ningún cambio fenotípico. Una vez finalizada la inducción adipogénica se analizó la acumulación lipídica mediante tinción con oil red O y se cuantificó por espectrofotometría (Figura 12). Se observó que los clones 1.7 y 1.22 acumulaban gran

cantidad de vesículas lipídicas en el interior celular, otros clones mostraban una cantidad moderada como en el caso de los clones 1.8, 1.29, 1.30, 1.31 y 1.32, mientras que el resto de los clones prácticamente no presentaban vesículas en el interior de sus células.



**Figura 12.** Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases de fases de los clones cultivados durante 21 días en medio adipogénico y teñidos después con oil red O. Barra 200  $\mu$ m. Aumentos 20x. Esquina inferior derecha, cuantificación por espectrofotometría de la tinción de oil red O. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar (n=2).

A continuación se procedió a analizar mediante RT-PCR a tiempo real la expresión del gen lipoproteína lipasa (LPL) en todos los clones una vez finalizada la diferenciación adipogénica. Se observó que los clones con mayor expresión para este gen característico de tejido adiposo son el 1.22 y 1.29 (Figura13), seguido de los clones 1.7, 1.8 y 1.31, mientras que el resto presentaban muy baja expresión. Los controles no mostraron expresión para dicho gen, como era de esperar ya que no se observó ningún cambio fenotípico. En este caso existe una mayor correlación entre los niveles de expresión génica y la cuantificación de vesículas lipídicas mediante espectrofotometría, aunque existen algunas excepciones, por ejemplo el clon 1.7 muestra un nivel de LPL similar al 1.8 pero acumula mayor cantidad de lípidos en sus células. De la misma forma, el clon 1.30 y 1.32 casi no muestran expresión de LPL pero sí se tiñen moderadamente con oil red O.



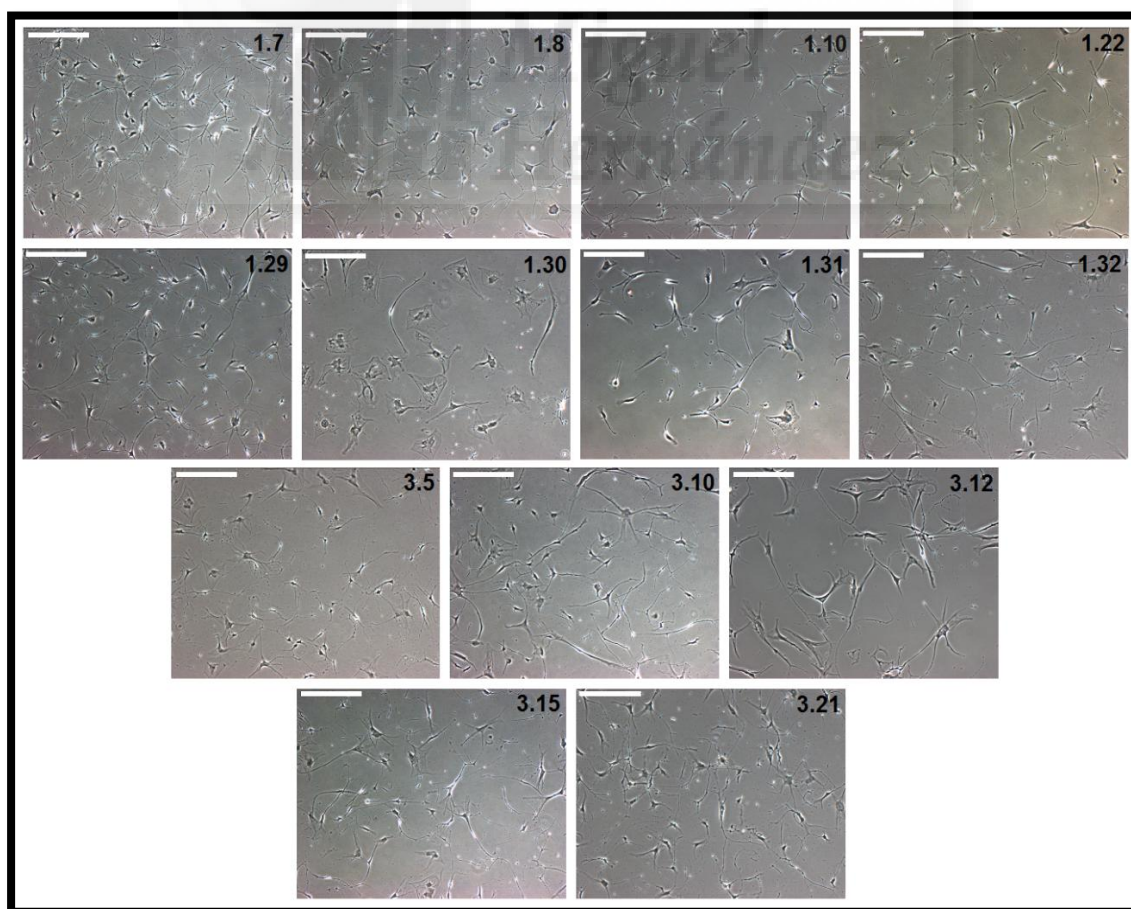
**Figura 13.** Análisis de la expresión relativa del gen Lipoproteína lipasa mediante RT-PCR a tiempo real una vez finalizada la inducción adipogénica. Datos representados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=2).

Cabe destacar que de los tres clones que no diferencian a linaje osteogénico, dos tampoco lo hacen a linaje adipogénico (1.10 y 3.10). Además, ninguno de los clones obtenidos del tercer donante es capaz de diferenciar a este tipo celular.



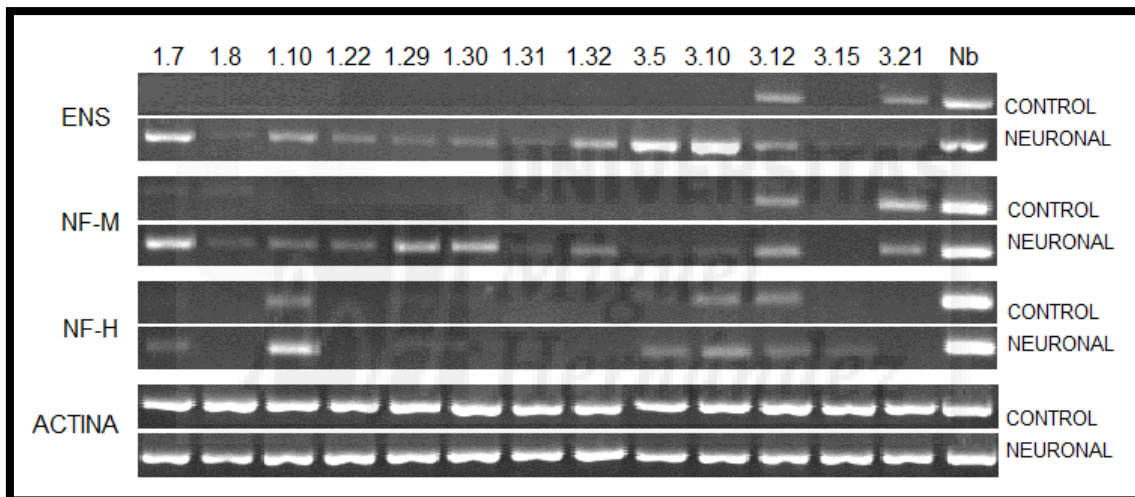
### 3.3. DIFERENCIACIÓN NEURONAL.

La capacidad de diferenciación neuronal se analizó en todos los clones por duplicado y utilizando siempre pases inferiores al 15. Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos (10.000 células/pocillo), manteniendo siempre un pocillo como control con medio de cultivo mesenquimal. Las células se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia ligeramente inferior al 50%, siguiendo las indicaciones del protocolo de diferenciación del kit AndvanceSTEM de Thermo Scientific (Hyclone, Logan, UT, USA). A las 24 h de iniciar la diferenciación comenzaron a observarse cambios fenotípicos, siendo el máximo a las 72 h, momento en el cual se dio por finalizado el ensayo. Mientras que en los pocillos control las células no mostraban ningún cambio, con el medio neuronal todos los clones mostraron cambios morfológicos. Dichas modificaciones consistieron en la aparición de prolongaciones citoplasmáticas que proporcionaban a las células un aspecto más estrellado (Figura 14), completamente diferente a la morfología de los controles (Figura 2).



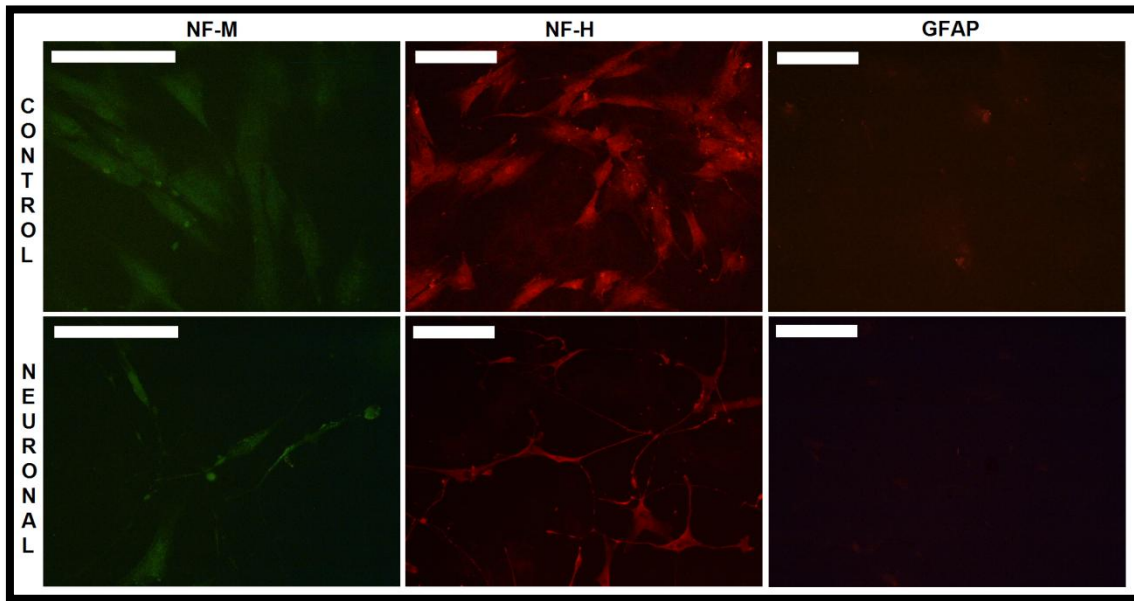
**Figura 14.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases de fases de todos los clones después de ser cultivados 72 h con medio de diferenciación neuronal. Barra 200  $\mu$ m. Aumentos 4x.

Trascurridas las 72 h de inducción, se procedió a analizar por RT-PCR convencional la expresión de marcadores típicos neuronales (Figura 15), como el gen de la enolasa 2 o enolasa neuroespecífica (ENS), neurofilamento intermedio (NF-M) y neurofilamento pesado (NF-H), utilizando como control positivo una línea celular de neuroblastoma humano (Nb). Se observó que en condiciones control existen ciertos clones que expresan ya estos marcadores, como el clon 3.12 que expresa los tres genes, el clon 3.21 que presenta señal para ENS y NF-M o los clones 1.10, 3.5 y 3.10 que expresan NF-H. Con el medio de cultivo neuronal se observó que en todos los clones se inducía el gen ENS y NF-M (excepto para el clon 3.15), mientras que NF-H no se expresa en muchos de los clones.



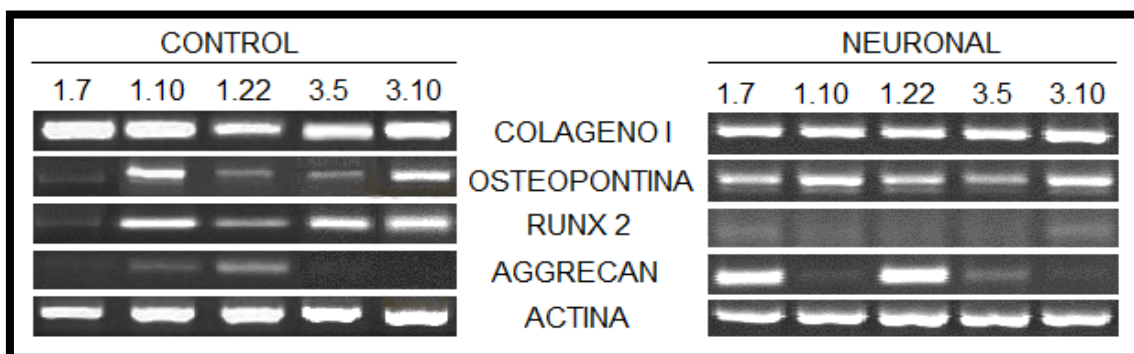
**Figura 15.** Expresión génica por RT-PCR de los clones para marcadores neuronales después de 72 h en cultivo con medio de diferenciación neuronal y con medio de cultivo mesenquimal como control.

Continuando con la caracterización, se procedió a analizar por inmunofluorescencia la presencia de neurofilamento intermedio (NF-M), neurofilamento pesado (NF-H) y proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Se analizaron varios clones trascurridas 72 h de diferenciación neuronal y las imágenes obtenidas se compararon con sus respectivos controles sin diferenciar. Se observó que no existían diferencias entre las células sin diferenciar y las diferenciadas, ya que en ambas condiciones el marcaje es positivo para NF-M y NF-H, mientras que GFAP presentaba una señal muy débil, como muestra por ejemplo el clon 1.10 (Figura 16).



**Figura 16.** Inmunofluorescencia del clon 1.10 después de 72h en cultivo con medio de diferenciación neuronal y con medio de cultivo mesenquimal como control. Aumentos 40x (NF-M) y 20x (NF-H y GFAP). Barra 200µm.

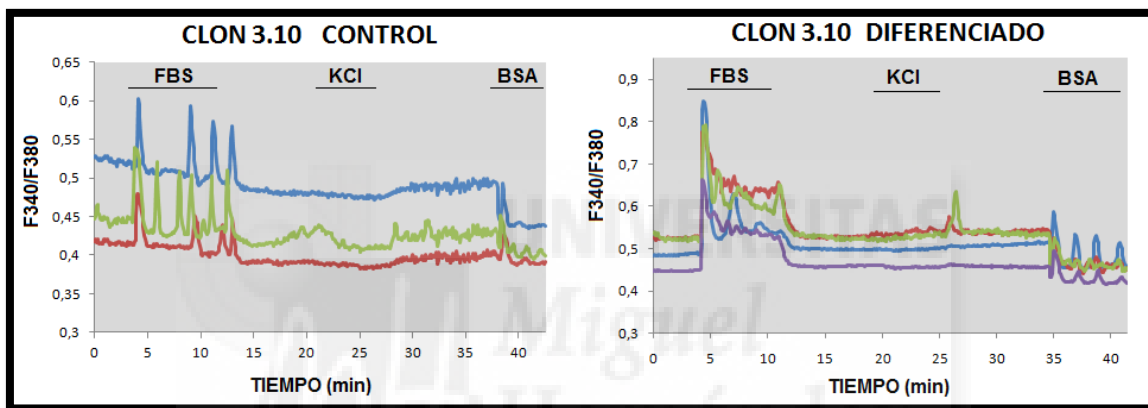
Estos resultados sugieren que aunque las células con medio de diferenciación neuronal adquieran una morfología alargada y con prolongaciones citoplasmáticas similares a las de neuronas, la inducción hacia este tipo celular no parece ser definitiva. Prueba de ello es que las células diferenciadas siguen manteniendo la expresión de marcadores osteogénicos (Figura 17) transcurridas 72 h de inducción. Así, se puede observar que aunque suelen perder la expresión de runx2, la mayoría de los clones siguen manteniendo la expresión de colágeno tipo I, osteopontina y aggrecan.



**Figura 17.** Expresión génica por RT-PCR de varios clones representativos para marcadores osteogénicos después de 72 h en cultivo con medio de diferenciación neuronal y con medio de cultivo mesenquimal como control.

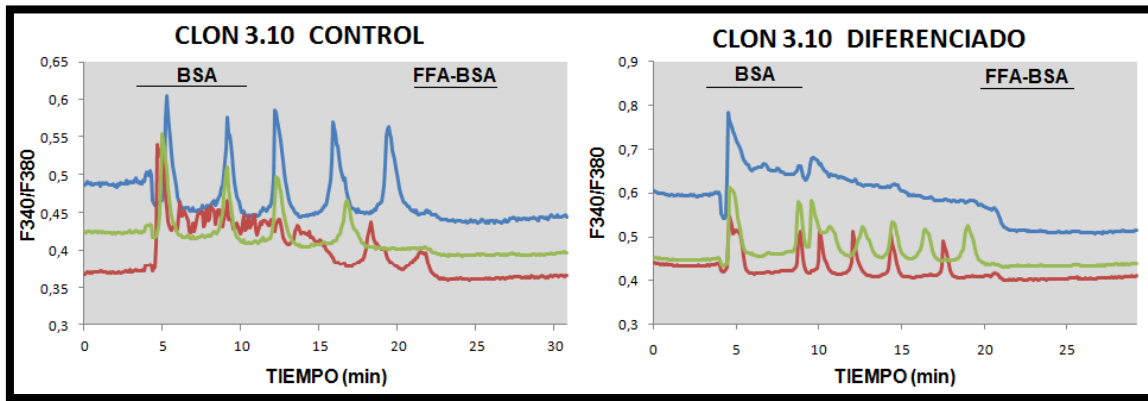


Por último, para obtener más información sobre el estado de diferenciación de estas células se realizó un ensayo funcional. Para ello se analizó la respuesta intracelular de calcio frente a distintos factores o estímulos extracelulares en varias poblaciones clonales seleccionadas y representativas (1.7, 1.10, 3.5 y 3.10), tras 72 h en cultivo con medio de diferenciación neuronal o con medio de cultivo mesenquimal como control. En ambos casos las células respondieron a FBS y también a BSA, pero no a concentraciones despolarizantes de KCl, como muestra por ejemplo el clon 3.10 (Figura 18).



**Figura 18.** Respuesta de calcio intracelular en poblaciones clonales de h\_ASC cultivadas tras 72 h con medio de diferenciación neuronal o con medio de cultivo mesenquimal como control. Cada línea de color representa el registro de una célula individual. En ambas condiciones de cultivo, la respuesta es positiva para FBS y BSA, pero no para KCl.

Estudios anteriores muestran que respuestas similares a  $\text{Ca}^{+2}$  han sido descritas en cultivos de astrocitos aislados de crías de ratas de 1 a 3 días (Nadal y col., 1995; Nadal y col., 1997), observándose una inhibición completa de la respuesta a BSA cuando es eliminada la fracción lipídica de la albúmina. Para probar esta posibilidad se analizó de nuevo la respuesta de  $\text{Ca}^{+2}$  frente a BSA libre de ácidos grasos, observándose dicha inhibición de la respuesta a BSA en ambos casos, en células diferenciadas y sin diferenciar, como muestra por ejemplo el clon 3.10 (Figura 19).



**Figura 19.** Respuesta de calcio intracelular en poblaciones clonales de *h\_ASC* cultivadas tras 72 h con medio de diferenciación neuronal o con medio de cultivo mesenquimal como control. Cada línea de color representa el registro de una célula individual. En ambas condiciones de cultivo la respuesta al BSA es inhibida tras la adición de BSA libre de ácidos grasos (FFA-BSA).

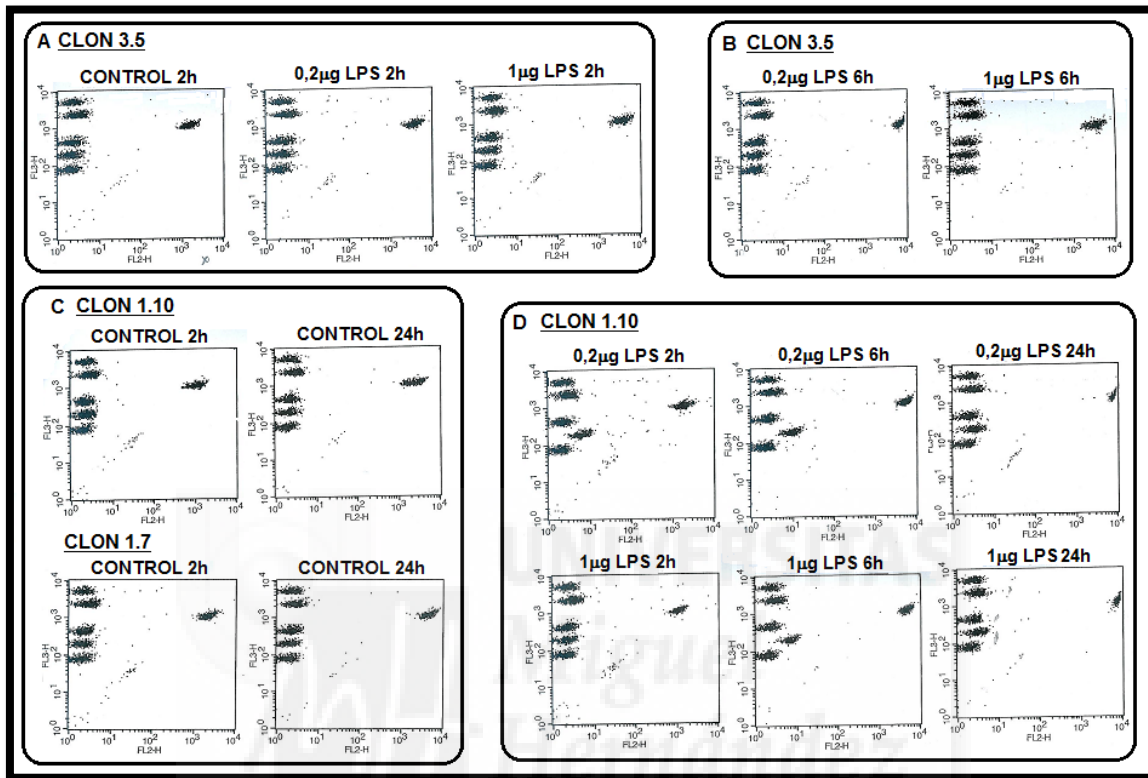
Estos resultados sugieren que la respuesta al BSA libre de ácidos grasos no es tan específica de linajes neuroectodérmicos y que las poblaciones clonales de *h\_ASC* cultivadas con este medio de diferenciación neuronal no son muy distintas funcionalmente a las células sin diferenciar. Atendiendo a la respuesta intracelular de  $Ca^{+2}$ , se pueden observar pequeñas diferencias entre las células control y las diferenciadas cuando son estimuladas con FBS y BSA. Los registros de algunas células frente a dichos estímulos son en forma de meseta, como se observa en la Figura 18 en las células diferenciadas estimuladas con FBS y en la Figura 19 la célula control (línea roja) y la diferenciada (línea azul) estimuladas con BSA. Este tipo de registros podría indicar una diferente capacidad de respuesta de estas células frente a dicho estímulo, pero sin llegar a ser indicativo de su grado de diferenciación, ya que este tipo de respuestas no es exclusivo de células neuronales.

#### 4. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS SECRETADAS POR POBLACIONES CLONALES DE h\_ASC.

Con la finalidad de estudiar el potencial de las células madre de tejido adiposo en terapia celular en base a su capacidad de modular la respuesta inmunitaria e inflamatoria, se realizaron varios ensayos de secreción de citocinas sobre cinco de las poblaciones clonales más representativas. Las poblaciones fueron seleccionadas en base a su capacidad de diferenciación hacia linaje osteogénico y adipogénico. Así pues, por su alta capacidad de diferenciación hacia ambos linajes se seleccionaron los clones 1.7 y 1.22, por el contrario, los clones 1.10 y 3.10 fueron seleccionados por no ser capaces de diferenciar, mientras que el clon 3.5 se seleccionó por diferenciar hacia linaje osteogénico pero no hacia el adipogénico. Las citocinas secretadas por estas poblaciones se detectaron mediante sistemas CBA en los sobrenadantes de las células cultivadas bajo distintos estímulos (PMA y LPS), ya que la expresión de citocinas puede ser inducida por factores exógenos como los citados (Gimble y col., 1989). El efecto de estos factores se comparó con las células sin estimular y a distintos tiempos, desde el momento inicial hasta las 72 h de inducción.

En un primer experimento se utilizó como estímulo LPS a distintas concentraciones para establecer la más efectiva. Para ello las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y estimuladas en ese mismo momento con concentraciones de LPS de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $\mu\text{g/ml}$ . Los sobrenadantes se recogieron a las 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h y se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Las citocinas analizadas fueron: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Los resultados mostraron en todos los clones una secreción espontánea y post-estimulación de IL-6 en cantidades altas, como presenta por ejemplo el clon 3.5 (Figura 20-A), aunque era un poco mayor tras la estimulación con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de LPS (Figura 20-B). También se observó en todos los clones un aumento en la secreción de IL-6 desde las 2 hasta las 24 h en en ambas condiciones, como muestran por ejemplo el clon 1.10 y 1.7 (Figura 20-C). Sin embargo, existen diferencias entre los distintos clones en cuanto a la cantidad que secretan, siendo el clon 1.10 el que menor cantidad secreta (Tabla 13). Además, sólo el clon 1.10 secreta también TNF- $\alpha$  en cantidades apreciables (Figura 20-D), apareciendo con un máximo a las 6 h y solamente en presencia del estímulo, siendo mayor a la concentración de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de LPS. Por lo

tanto, 0,2 y no 1  $\mu\text{g/ml}$  parece ser la concentración óptima de LPS para estimular con mayor efectividad la producción de citocinas en las células h\_ASC.



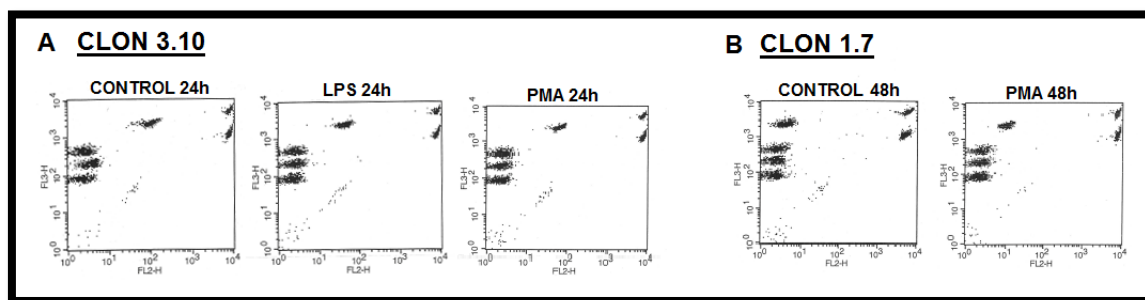
**Figura 20.** Análisis de citocinas Th1/Th2 por citometría de flujo, las nubes de puntos corresponden a IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , en orden descendente. A) IL-6 es secretada en concentraciones elevadas tanto en condiciones control como con LPS. B) El efecto en la secreción de IL-6 es mayor con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de LPS que con 1  $\mu\text{g/ml}$ . C) Los distintos clones secretan cantidades diferentes de IL-6, la cual incrementa con el tiempo desde las 2 hasta las 24h. D) El clon 1.10 secreta también TNF- $\alpha$  cuando es estimulado, siendo mayor la cantidad secretada transcurridas 6 h desde la inducción y con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de LPS.

También se detectó en todos los clones secreción leve de IL-2 (Tabla 13) y de IL-10 en algunas condiciones. Sólo se detectó en el clon 1.22 secreción leve de IFN- $\gamma$  a las 2 h de ser estimulado con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de LPS (1,3 pg/ml) y a las 24 h de ser estimulado con 1  $\mu\text{g/ml}$  (1,4 pg/ml). Solamente en el clon 3.5 se detectó secreción de IL-4 a las 6 h de ser estimulado con 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS (1,5 pg/ml).

Tabla 13. Cuantificación de citocinas Th1/Th2 secretadas por los distintos clones de h\_ASC estimulados con LPS a distinta concentración en el momento de su siembra y sin estimular (control).

		IL-6 (pg/ml)			TNF- $\alpha$ (pg/ml)			IL-2 (pg/ml)			IL-10 (pg/ml)		
		Control	LPS 0,2 $\mu$ g/ml	LPS 1 $\mu$ g/ml	Control	LPS 0,2 $\mu$ g/ml	LPS 1 $\mu$ g/ml	Control	LPS 0,2 $\mu$ g/ml	LPS 1 $\mu$ g/ml	Control	LPS 0,2 $\mu$ g/ml	LPS 1 $\mu$ g/ml
Clon 1.7	2 h	4897,9	>5000	>5000	$\leq 0$	1,5	$\leq 0$	1,6	1,8	1,5	$\leq 0$	1,7	$\leq 0$
	6 h	-	>5000	>5000	-	$\leq 0$	$\leq 0$	-	1,5	1,6	-	$\leq 0$	$\leq 0$
	24 h	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$	1,4	1,6	1,6	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$
Clon 1.10	2 h	1433,9	3802,9	1342,2	1,4	8,8	1,4	1,6	1,5	1,6	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$
	6 h	-	>5000	>5000	-	13,7	9,5	-	1,7	1,8	-	1,7	$\leq 0$
	24 h	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	3,7	3,6	1,5	1,8	1,8	$\leq 0$	1,5	$\leq 0$
Clon 1.22	2 h	>5000	>5000	>5000	<0	1,7	2	1,8	1,9	1,3	$\leq 0$	$\leq 0$	1,5
	6 h	-	>5000	>5000	-	1,7	1,5	-	1,8	1,5	-	$\leq 0$	$\leq 0$
	24 h	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	2,2	1,8	1,6	1,7	1,5	$\leq 0$	1,7
Clon 3.5	2 h	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	1,5	$\leq 0$	1,7	1,8	2	1,5	2	$\leq 0$
	6 h	-	>5000	>5000	-	$\leq 0$	1,8	-	1,9	2,2	-	$\leq 0$	2,1
	24 h	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$	1,9	1,7	1,6	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$
Clon 3.10	2 h	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$	1,6	1,6	1,6	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$
	6 h	-	>5000	>5000	-	1,5	$\leq 0$	-	1,8	1,9	-	$\leq 0$	1,5
	24 h	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$	1,7	1,6	1,7	$\leq 0$	1,6	$\leq 0$

En un segundo experimento se utilizó como estímulo LPS o PMA y se analizó la producción de otras citocinas. Además las células una vez tripsinizadas se dejaron unos días en cultivo antes de ser estimuladas, a diferencia del ensayo anterior donde las células se estimularon en el mismo momento de ser sembradas. Para ello las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y estimuladas después de 4 días con 0,2  $\mu$ g/ml de LPS o 25 ng/ml de PMA más ionomicina. Los sobrenadantes se recogieron a las 0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h y se congelaron a -20 °C para su posterior análisis. Las citocinas analizadas fueron: IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12. Los resultados observados fueron similares a los anteriores, todos los clones mostraban secreción espontánea y post-estimulación de IL-6 e IL-8 en cantidades elevadas y de IL-1 $\beta$  en cantidades más bajas (Figura 21). Además no parecían existir grandes diferencias entre los dos estímulos, como muestra por ejemplo el clon 3.10 (Figura 21-A). También se observó que existían diferencias en cuanto a las cantidades secretadas por los distintos clones (Tabla 14), siendo el clon 1.7 el que menor cantidad de IL-1 $\beta$  secretaba (Figura 21-B).

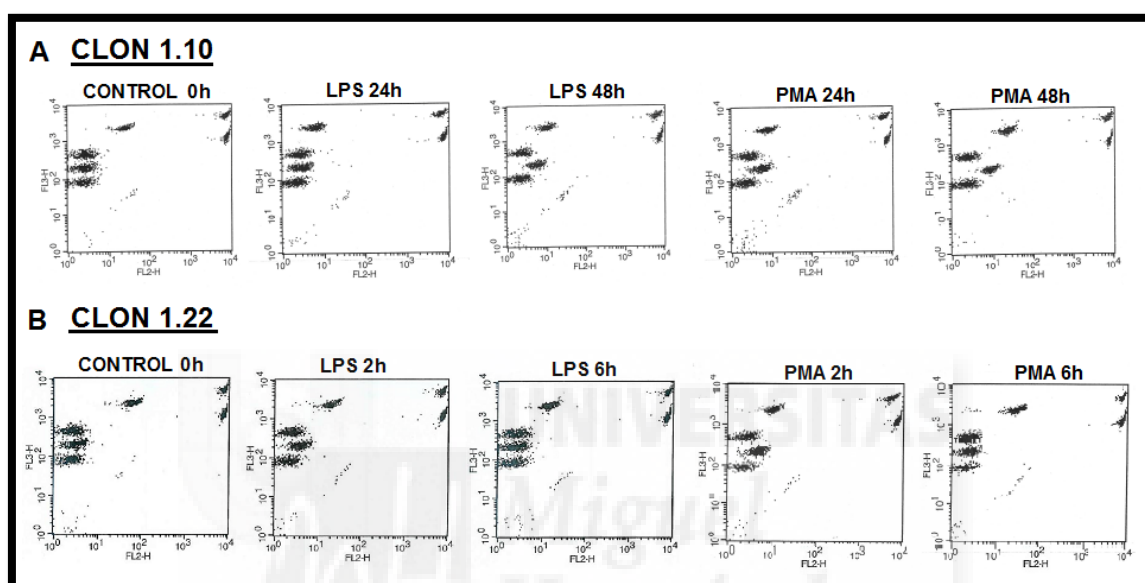


**Figura 21. Análisis de citocinas por citometría de flujo, las nubes de puntos corresponden a IL-8, IL-18, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12, en orden descendente. A) IL-8, IL-18 e IL-6 es secretada por todos los clones tanto en condiciones control como con ambos estímulos. B) Los distintos clones secretan cantidades diferentes de las 3 citocinas, siendo siempre menor la IL-18 y el clon 1.7 el que menor cantidad secreta.**

**Tabla 14. Cuantificación de citocinas secretadas por distintos clones de h\_ASC estimulados con 0,2  $\mu$ g/ml de LPS o con 25 ng/ml de PMA+ionomicina después de 4 días desde su siembra y sin estimular (control a tiempo 0).**

		IL-1 $\beta$ (pg/ml)		IL-6 (pg/ml)		IL-8 (pg/ml)		TNF $\alpha$ (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)	
		LPS	PMA	LPS	PMA	LPS	PMA	LPS	PMA	LPS	PMA
Clon 1.7	2 h	2,6	1,7	>5000	>5000	>5000	>5000	1	$\leq 0$	1,1	$\leq 0$
	6 h	4	1,2	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	$\leq 0$	1,3
	24 h	3,7	2,3	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	1,1	1,1
	48 h	4,4	6,4	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	1,1	1,1	1,1
	Control	2		>5000		>5000		$\leq 0$		1	
Clon 1.10	2 h	5,3	13,2	>5000	>5000	>5000	>5000	1,3	1,3	$\leq 0$	1,1
	6 h	8,9	10,1	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	1,2	$\leq 0$	1
	24 h	3,6	5	>5000	>5000	>5000	>5000	1,4	3,5	1,1	1,1
	48 h	6	15	>5000	>5000	>5000	>5000	3,4	5,7	$\leq 0$	$\leq 0$
	Control	15,9		>5000		>5000		1,2		1,1	
Clon 1.22	2 h	13,8	6,4	>5000	>5000	>5000	>5000	2,2	2,6	1	$\leq 0$
	6 h	9,6	17,6	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	1	1
	24 h	7,7	11,1	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	1,1	$\leq 0$
	48 h	13	29,4	>5000	>5000	>5000	>5000	1,1	$\leq 0$	1	$\leq 0$
	Control	42,1		>5000		>5000		1,7		1,1	
Clon 3.5	2 h	-	-	>5000	>5000	>5000	>5000	-	1,5	2	-
	6 h	915,2	-	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	1,8	$\leq 0$	-
	24 h	25,43	-	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	-	$\leq 0$	-
	48 h	-	-	>5000	>5000	>5000	>5000	-	-	-	-
	Control	12,12		>5000		>5000		$\leq 0$		1,5	
Clon 3.10	2 h	36	19,2	>5000	>5000	>5000	>5000	1,5	$\leq 0$	1	1
	6 h	23,4	19,9	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	$\leq 0$	1,1	$\leq 0$
	24 h	29,7	42,9	>5000	>5000	>5000	>5000	1,1	$\leq 0$	1	1
	48 h	34,5	91,6	>5000	>5000	>5000	>5000	$\leq 0$	1	1	$\leq 0$
	Control	66,3		>5000		>5000		1,9		$\leq 0$	

Al igual que en el experimento anterior, el clon 1.10 expresa también TNF- $\alpha$  además de las otras 3 citocinas, aunque en menor cantidad y sólo cuando es estimulado (Figura 22-A). En este caso, el efecto del PMA a las 48 h parece ser mayor que con LPS. Además, también se detectó secreción de TNF- $\alpha$  por el clon 1.22 en presencia de ambos estímulos, aunque solo aparecía a las 2 h y en menor cantidad (Figura 22-B).



**Figura 22. Análisis de citocinas por citometría de flujo, las nubes de puntos corresponden a IL-8, IL-18, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12, en orden descendente. A) El clon 1.10 secreta además TNF- $\alpha$  cuando es estimulado, siendo mayor la cantidad secretada con PMA a las 48 h. B) El clon 1.22 también secreta TNF- $\alpha$ , aunque solo es detectado en poca cantidad y a las 2 h de ser estimulado.**

También se detectó en todos los clones secreción débil de IL-10 (Tabla14). Sólo en dos clones se detectó secreción baja de IL-12 e IFN- $\gamma$  en los controles sin estimular (clon 1.7: 11,5 pg/ml IL-12 y 14,3 pg/ml IFN- $\gamma$ ; clon 1.22: 9,96 pg/ml IL-12 y 2,53 pg/ml IFN- $\gamma$ ). Solamente se detectó en el clon 3.5 secreción leve de IL-4 (23,5 pg/ml) a las 24 h post-estimulación.



*DISCUSIÓN*



## 1. LA SELECCIÓN CLONAL EN CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO PERMITE OBTENER POBLACIONES CON DISTINTA PLASTICIDAD.

Debido a la simple metodología utilizada para el aislamiento de células madre mesenquimales, ya sean de médula ósea o de tejido adiposo, los cultivos de estas poblaciones recién aisladas suelen ser relativamente heterogéneos. Esta variabilidad ha podido ser observada también a nivel clonal, obteniéndose poblaciones derivadas de una única célula con distinta capacidad de crecimiento y diferente potencial de diferenciación (Guilak y col., 2006; Mareddy y col., 2007). Los clones aislados en el presente estudio presentan ligeras diferencias en morfología y tasa de proliferación. Aunque no ha sido cuantificado, se ha observado por ejemplo que el clon 1.8 presenta una tasa de crecimiento más lenta que el resto (tarda de 5 a 7 días más en alcanzar el 90-100% de confluencia) o por ejemplo el clon 3.10 y 3.21 están formados por células de menor tamaño que las del resto de los clones. Sin embargo, la heterogeneidad más relevante se encuentra en la distinta plasticidad a la hora de diferenciar a diversos linajes (Tabla 13), existiendo clones con alta capacidad de diferenciación como el 1.7, 1.8 y 1.22, otros con nula capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos como el 1.10, 1.30 y 3.10, y otros que pueden diferenciar a linaje osteogénico pero no adipogénico como el 1.32 y 3.5, entre otros.

Tabla 15. Capacidad de diferenciación hacia distintos linajes de clones aislados de h\_ASC.  
(+ sí diferencia; - no diferencia)

	DONANTE 1								DONANTE 3				
LINAJE	1.7	1.8	1.10	1.22	1.29	1.30	1.31	1.32	3.5	3.10	3.12	3.15	3.21
Osteogénico	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Adipogénico	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Neurogénico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Se sabe que las células madre mesenquimales son poblaciones heterogéneas de células con distinta capacidad de diferenciación y, con el fin de identificar genes y proteínas implicados en la proliferación y diferenciación de estas células, se han realizado varios estudios de expresión génica (Song y col., 2006; Mareddy y col., 2010). Sin embargo, siguen sin esclarecerse los mecanismos moleculares que regulan la proliferación y el mantenimiento del estado indiferenciado, el inicio de los procesos de diferenciación o las moléculas capaces de identificar las distintas subpoblaciones funcionales en estas células. En otros tipos de células madre son bastante conocidas las bases moleculares que regulan la proliferación y pluripotencialidad, como en el caso de las ESC, donde gracias a la activación de un sistema de comunicación intracelular regulado por distintas señales, pueden mantener *in vitro* su pluripotencialidad y su estado indiferenciado. Se conocen varios tipos de moléculas implicadas en este sistema de comunicación, por ejemplo factores externos como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), la proteína Wnt, el factor LIF, las BMP o el TGF $\beta$ , pero también factores de transcripción intracelulares como Oct-4, Sox-2 y Nanog (Boiani y Scholer, 2005), pueden participar en estas cascadas de señalización intracelulares. En los últimos años, también se han descrito algunas de estas vías de señalización que regulan la proliferación y/o la diferenciación celular en las ASC, como Wnt y FGF-2 (Cho y col., 2006; Zaragosi y col., 2006). Además, también se ha propuesto que la expresión factores de transcripción como Oct-4, Sox-2, Nanog y Rex-1, desempeñen un papel similar en células madre adultas. Sin embargo, existe cierta variabilidad y controversia en los distintos trabajos publicados en cuanto a la expresión de estos genes en células madre mesenquimales (Pierantozzi y col., 2010). Varios trabajos han descrito en células madre mesenquimales aisladas de distintos tejidos la expresión de Oct-4 y Sox-2 mediante RT-PCR (Riekstina y col., 2009; Roche y col., 2007), pero sin confirmar su presencia a nivel de proteína, aspecto importante a tener en cuenta, ya que estos genes poseen pseudogenes (o ARNs de interferencia) que pueden dar lugar a falsos positivos en estudios a nivel de ARNm.

En este trabajo se ha analizado por RT-PCR la expresión de varios genes marcadores del estado indiferenciado y de pluripotencialidad. Todos los clones expresan varios de estos genes, pero no se ha podido establecer ninguna correlación entre expresión génica y pluripotencialidad, ya que clones como el 1.10 y 3.10 que no diferencian hacia linaje mesodérmico presentan expresión para todos los genes

analizados. Puede ser que la expresión de estos marcadores en células madre adultas sea consecuencia de una adaptación a las condiciones de cultivo *in vitro* y esté más relacionada con la capacidad de autorrenovación y proliferación de las células que con el potencial de diferenciación. Con la finalidad de identificar poblaciones con mayor potencial de diferenciación hemos iniciado estudios epigenéticos, esperando que podamos establecer algún tipo de correlación entre los perfiles de metilación del ADN y la distinta plasticidad observada en los clones aislados.



## **2. POBLACIONES CLONALES DE h\_ASC POSEEN DIFERENTES POTENCIALES DE DIFERENCIACIÓN HACIA LINAJE OSTEOGÉNICO.**

Las células madre de tejido adiposo tienen el potencial de diferenciar hacia distintos linajes, entre ellos el osteogénico. Sin embargo, debido a la heterogeneidad presente en este tipo de poblaciones celulares, es importante profundizar más en el estudio y posterior análisis de estos procesos de diferenciación. Esto conduciría a determinar las condiciones óptimas para lograr con mayor éxito la regeneración ósea, mejorando al mismo tiempo las aplicaciones en la ingeniería de tejidos.

El presente estudio ha demostrado inicialmente que, debido probablemente al alto nivel de expresión basal en varios de los genes característicos de linaje osteogénico, el análisis por RT-PCR convencional puede no ser la mejor forma de analizar y establecer las condiciones óptimas para inducir la diferenciación osteogénica. De igual forma, el análisis por RT-PCR a tiempo real, tampoco proporciona una herramienta útil para establecer alguna relación entre niveles de expresión génica y potencial de diferenciación hacia linaje osteogénico. Sin embargo, los resultados de este trabajo sugieren que el estudio de la diferenciación osteogénica en h\_ASC debe ser evaluado basándose tanto en el análisis de características fenotípicas como en pruebas funcionales. Por consiguiente, la observación de la disposición paralela de las fibras de colágeno junto con la formación de depósitos de calcio durante los procesos de mineralización, conduciría al establecimiento no sólo de las condiciones óptimas para la diferenciación, sino también de las poblaciones celulares con mayor potencial hacia dicho linaje.

Los resultados de este trabajo muestran cómo los distintos clones aislados de células madre de tejido adiposo pueden presentar diferentes potenciales de diferenciación, además este hecho se repite en poblaciones celulares aisladas de distintos donantes. Por ejemplo, los clones 1.7 y 1.10, obtenidos del primer donante, a pesar de presentar niveles de expresión génica similares para *runx2*, no tienen la misma capacidad de diferenciación. Lo mismo sucede con los clones 3.10 y 3.12 del tercer donante. Sin embargo, una característica interesante que ha quedado claramente establecida es la morfología que presentan estos clones durante su cultivo. Los clones

con alta capacidad de mineralización, como el 1.7 y 3.12, forman unas lagunas o calvas que van incrementando en tamaño a lo largo del cultivo. Al mismo tiempo, estos clones muestran una disposición paralela de las fibras de colágeno bien definida alrededor de estas lagunas. Por el contrario, los clones con prácticamente nula mineralización, como el 1.10 y 3.10, no presentan estas características fenotípicas.

Este estudio comparativo demuestra por tanto, la existencia de clones con la capacidad de originar precursores osteogénicos con diferentes propiedades funcionales. La presencia de dos tipos distintos de osteoprogenitores mesenquimales con diferentes patrones de expresión de colágeno ha sido descrita anteriormente (Shapiro, 2008), unos presentes en el hueso laminar y con una orientación polarizada del colágeno, y otros con una disposición aleatoria que corresponden al tejido óseo. Interesantemente, los clones estudiados pueden correlacionarse con estos dos tipos de osteoprogenitores en cuanto a colágeno se refiere. En este sentido, es importante indicar que todos los clones presentan niveles similares de expresión de colágeno tipo 1, lo que sugiere, como se ha descrito en anteriores trabajos, que diferentes condiciones o procesos deben regular la mineralización, no solo la estructura del colágeno (Landis y col., 1993). Además también puede ser importante la presencia de otros componentes adicionales en la mineralización, como diversos proteoglicanos (Mochida y col., 2009).

Por lo tanto, estos resultados muestran que los clones aislados no solo presentan distintos potenciales de diferenciación osteogénica y diferente capacidad de regeneración ósea, sino que además distintos precursores mesenquimales pueden ser aislados *in vitro* con la finalidad de mejorar la reparación ósea. Sin embargo, esta correlación entre diferenciación ósea *in vitro* y regeneración ósea *in vivo* debe ser mejor estudiada. En este sentido, varios estudios con células mesenquimales de médula ósea evidencian la presencia de colonias o poblaciones altamente purificadas con diferente potencial en la formación ósea *in vivo* (Kutnetsov y col., 1997; Gronthos y col., 2003). Estos estudios muestran que solo la mitad de las poblaciones clonales, aproximadamente, tienen la capacidad de formar hueso *in vivo* cuando son transplantadas. Según estos datos, es probable que los clones aislados en este trabajo también presenten distinta capacidad para la regeneración ósea *in vivo*.

Para mejorar el uso de h\_ASC en terapia celular, los resultados de este trabajo sugieren la selección clonal y el análisis funcional como mejores herramientas. Debido a los resultados poco definitivos mostrados cuando la expresión de marcadores osteogénicos es utilizada para estudiar la diferenciación osteogénica *in vitro*, nuevos estudios deben ser llevados a cabo con la intención de identificar marcadores moleculares en estas células relacionados con una mayor capacidad multipotente.



### **3. CLONES AISLADOS DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO PRESENTAN DISTINTA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN A LINAJE ADIPOGÉNICO.**

Como en el caso anterior, las células madre de tejido adiposo tienen el potencial de diferenciar hacia linaje adipogénico. De la misma forma, el estudio en profundidad de estos procesos de diferenciación conduciría a mejorar y acelerar el desarrollo de aplicaciones clínicas. En este sentido, estas células pueden tener un papel importante en la reconstrucción de tejidos blandos. Por ejemplo, en el área de la cirugía plástica reconstructiva, donde se ven afectadas grandes zonas de tejido blando, ya sea debido a un trauma o por una resección quirúrgica (por ejemplo una mastectomía), están siendo cada vez más utilizadas como complemento y con la finalidad de corregir defectos después de este tipo de cirugías, mejorando los contornos, disimulando cicatrices o aumentando el volumen de la zona intervenida. Sin embargo, la reconstrucción de grandes áreas únicamente con trasplantes de grasa autólogos, conlleva ciertos problemas relacionados con la angiogénesis y el mantenimiento a largo plazo del volumen injertado. Diversos trabajos han mostrado como el tratamiento con estas células mejora la situación y ayuda a reparar los tejidos dañados en zonas que cicatrizan mal debido a una mala vascularización como en úlceras, fístulas, enfermedad de Crohn o infartos de miocardio (García-Olmo y col., 2008; Schuldt y col., 2008). Por este motivo, la purificación y selección clonal de h\_ASC puede mejorar este tipo de injertos favoreciendo la adipogénesis y angiogénesis, además de poder combinarse con distintos biomateriales como hidrogeles (Stosich y col., 2007).

En este trabajo se muestra no sólo la existencia de clones de h\_ASC con distinto potencial de diferenciación hacia linaje adipogénico, sino que este potencial puede depender del donante. Los resultados revelan que los clones derivados del tercer donante tienen una limitada capacidad de diferenciación frente a los del primer donante, donde se observa una gran variabilidad en la formación de vesículas lipídicas. Estudios previos han demostrado como la edad del donante puede ser un factor determinante, disminuyendo la capacidad de diferenciación adipogénica conforme aumenta la edad, siendo mucho más significativo a partir de los 40 años (Hauner y col., 1989). Por otro lado, es necesario la realización de nuevos estudios con la finalidad de correlacionar el

distinto potencial de diferenciación adipogénica *in vitro* de los diversos clones con la capacidad de regeneración del tejido adiposo *in vivo*.

En la actualidad todavía no se conocen los factores responsables de la señalización *in vivo* de las células madre multipotentes hacia linaje adipogénico. Se sabe que los glucocorticoides, IGF-1 (factor de crecimiento insulínico-1) y compuestos que incrementan el nivel de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) juegan un papel importante (Otto y Lane, 2005). De hecho, los medios de inducción para adipogénesis están habitualmente suplementados con estos factores.

En cuanto a los mecanismos moleculares que regulan la ruta de diferenciación adipogénica *in vitro* se sabe que es importante la expresión de ciertos genes o proteínas implicados en la biosíntesis y almacenamiento de lípidos, como por ejemplo: 1) incremento de la actividad GPDH (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa), enzima implicada en la síntesis de triglicéridos; 2) aumento de la expresión de LPL (lipoproteína lipasa), enzima implicada en la hidrólisis de triglicéridos; 3) inducción de la expresión de PPAR $\gamma$  (receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales), factor de transcripción implicado en el compromiso a preadipocitos; y 4) aumento de aP2 (proteína de adipocitos 2), proteína citosólica transportadora de lípidos, implicada en la acumulación de lípidos en los adipocitos maduros. La expresión de estos genes en células h\_ASC inducidas hacia linaje adipogénico es similar a la que presenta la línea celular de preadipocitos de ratón 3T3. Sin embargo, los tiempos de expresión difieren a los que presentan los precursores adipogénicos, por ejemplo aP2 que se restringe a la fase tardía del desarrollo de adipocitos es detectado tempranamente en h\_ASC y antes que PPAR $\gamma$  (Zuk y col., 2002). Estas alteraciones en la secuencia génica durante los procesos de diferenciación implican que la simple detección por RT-PCR de unos u otros marcadores génicos no debe ser suficiente para asegurar que las células se han diferenciado o no con éxito, siempre deben de llevarse a cabo pruebas funcionales. En este trabajo se ha cuantificado la expresión de LPL en los clones diferenciados hacia linaje adipogénico, mostrando como clones que presentan una expresión muy baja de LPL (1.30 y 1.32) se pueden teñir moderadamente con Oil Red, y clones con similar nivel de expresión de LPL (1.7 y 1.8) pueden presentar distinta capacidad de acumulación de lípidos. Esto indica que no existe una correlación exacta entre nivel de expresión génica de LPL y capacidad de tinción con Oil Red.



#### **4. CLONES DE h\_ASC ADQUIREN MORFOLOGÍA NEURONAL AL SER INDUCIDOS HACIA LINAJE NEUROGÉNICO.**

Recientemente se ha descrito que las células madre mesenquimales de médula ósea tienen la capacidad de diferenciar hacia linaje neuroectodérmico y adquirir fenotipos neuronales (Woodbury y col., 2000; Sánchez-Ramos y col., 2000). Las células madre derivadas de tejido adiposo también tienen la capacidad de diferenciar a células neuronales usando protocolos similares a los utilizados por Woodbury y Sánchez-Ramos (Zuk y col., 2002; Guilak y col., 2006). Estos estudios abren la posibilidad de utilizar este tipo de células para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, suponiendo una nueva estrategia en la regeneración del tejido nervioso dañado.

Sin embargo, en los últimos años se ha puesto en duda la capacidad de diferenciación de las BMSC en células neuronales y por consiguiente también se discute esta plasticidad en las células madre de tejido adiposo (Kompisch y col., 2010). La inducción del fenotipo neuronal en este tipo de células se suele llevar a cabo a través de la adición a los medios de cultivo de distintos compuestos químicos como  $\beta$ -mercaptoetanol (BME), dimetilsulfoxido (DMSO) o hidroxibutilanisol (BHA), aunque también se han utilizado ácido retinóico y cócteles de citocinas (Sánchez-Ramos y col., 2000; Kim y col., 2002) o agentes que elevan los niveles intracelulares de AMPc (Deng y col., 2001). En todos los casos, las células son capaces de adquirir fenotipos neuronales, con prolongaciones citoplasmáticas y morfologías estrelladas o piramidales.

Varios estudios revelan que estos cambios morfológicos no son consecuencia del crecimiento de neuritas, sino que se deben a una retracción celular y rápida rotura del citoesqueleto de actina causada por la toxicidad celular de los compuestos utilizados para dicha diferenciación (Lu y col., 2004; Neuhuber y col., 2004). Es más, estos trabajos también discuten los cambios en la expresión génica y en las inmunocitoquímicas presentados por Woodbury y demás autores como prueba de la inducción y diferenciación neuronal. La expresión de distintos marcadores neuronales como ENS, NeuN, NF-M o nestina por ejemplo, pueden ser también detectados en poblaciones indiferenciadas de BMSC. Lo mismo sucede con las inmunocitoquímicas, en las que el incremento de marcaje observado en las células diferenciadas puede

deberse al incremento en antígeno por unidad de área y no por un incremento en la concentración de proteína. Finalmente, Lu y Neuhuber, concluyen que estos cambios observados no son resultado de una verdadera diferenciación neuronal, sino más bien, respuestas celulares al estrés químico al que están sometidas las células.

Trabajos similares han sido realizados con células madre de tejido adiposo, dando lugar a conclusiones parecidas a las anteriores, detectándose expresión de marcadores neuronales tanto en células diferenciadas como en indiferenciadas (Safford y col., 2002; Zuk y col., 2002; Guilak y col., 2006). Sin embargo, no se ha observado en ningún caso, ya sea a nivel génico o de proteína, marcadores característicos de células neuronales maduras, como MAP-2, TAU, GFAP, sinapsina o galactocerebroside, por ejemplo.

La idea importante que se puede extraer de estos trabajos es que para demostrar una verdadera diferenciación neuronal no sirve con observar la aparición de morfologías neuronales, ni la expresión de genes marcadores de linaje neuronal. Es absolutamente necesario demostrar la funcionalidad de estas células a través, por ejemplo, de pruebas electrofisiológicas que indiquen una función sináptica en las células diferenciadas, pero pocos estudios han realizado este tipo de ensayos. Ashjian y colaboradores en 2003 realizaron experimentos de *patch clamp* y determinaron que las células diferenciadas no eran capaces de despolarizarse y polarizarse, mostrando que no podían funcionar como neuronas maduras. Pero sin embargo, indicaron la presencia de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (canales iónicos que aparecen temprano en el desarrollo neuronal), aunque no queda claro si es verdaderamente un efecto inducido, ya que no se menciona nada sobre los registros en las células control. En este sentido, otro trabajo de Safford y colaboradores en 2004, indicó la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje (detectaron la presencia de la subunidad  $\alpha-1$ ), pero sin la realización de pruebas electrofisiológicas. Por tanto, aún queda por determinar si esta diferenciación neuronal podría, en todo caso, conducir a la obtención de células neuronales inmaduras o precursores de este linaje.

Los resultados presentados en este trabajo apoyan las conclusiones obtenidas por Lu y Neuhuber, ya que se ha detectado, tanto por RT-PCR como por inmunofluorescencia, la expresión de marcadores neuronales en células diferenciadas e

indeferenciadas, siendo algo mayor en las diferenciadas, al igual que observaba Woodbury. Además, las células adquieren rápidamente la morfología neuronal cuando son inducidas, pero si el medio de inducción se vuelve a cambiar por medio de cultivo mesenquimal una vez finalizada la diferenciación, las células con fenotipo neuronal vuelven a recuperar su morfología normal a las pocas horas. Este hecho apoya la idea de que esta apariencia estrellada y piramidal puede ser fruto de la toxicidad a los compuestos utilizados. En este trabajo se ha utilizado como medio de diferenciación uno comercializado por la casa Hyclone (varias casas comerciales tienen medios de este tipo), pero debido al recelo de las empresas por revelar la composición de sus medios se desconoce qué supuestos factores inductores de la diferenciación están presentes. Dentro de la información que proporcionan las casas comerciales para validar su protocolo, muestran inmunocitoquímicas para marcadores neuronales en las células diferenciadas, pero no presentan datos sobre los controles. En cualquier caso, estos medios comerciales parecen funcionar de la misma forma que los utilizados en los distintos trabajos anteriormente citados.

En este estudio se han realizado también pruebas funcionales para intentar obtener más información sobre el estado de diferenciación y la funcionalidad de dichas células. Los canales iónicos son muy importantes en las células excitables, como las neuronas, ya que les permiten responder a distintos estímulos y señales extracelulares pudiendo transmitir esta información a través de la propagación de potenciales de acción por medio de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje. Además, esta despolarización del potencial de membrana puede activar canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje, los cuales juegan un papel importante en el control de la excitabilidad y en procesos celulares que dependen del  $\text{Ca}^{+2}$ , como la liberación de neurotransmisores. En los ensayos realizados se ha observado que, tanto las células diferenciadas como las indiferenciadas, presentan similares respuestas intracelulares de calcio cuando son estimuladas con distintos factores. En ningún caso las células son capaces de responder a concentraciones despolarizantes de KCl (clásico estímulo despolarizante en células excitables). Por lo tanto, al igual que observó Ashjian, estas células no son electrofisiológicamente funcionales y la simple existencia de estos canales de  $\text{Ca}^{+2}$  y/o  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje no proporciona ninguna prueba relevante sobre el estado de diferenciación de las mismas, ya que estos canales no son exclusivos de células neuronales.

Aunque la diferenciación *in vitro* hacia linaje neuroectodérmico sea discutida, existen trabajos *in vivo* muy interesantes tanto con células madre de médula ósea como de tejido adiposo. Estos trabajos muestran que las células ASC cuando son intracranalmente transplantadas en animales con daños neurales, pueden migrar a las zonas dañadas del cerebro y producir una mejoría en el animal (Kang y col., 2003). Otros trabajos que merecen especial interés son los llevados a cabo por el grupo del Dr. Vaquero del hospital Puerta del Hierro, en los que han sido capaces de recuperar lesiones medulares en ratones y cerdos mediante la administración de BMSC (Zurita y Vaquero, 2006; Zurita y col., 2008). Este grupo comenzará en breve un ensayo clínico con 12 pacientes con lesiones medulares. Aunque en estos trabajos no se muestren evidencias de una diferenciación neuronal, queda patente la existencia de una mejora funcional en el tejido dañado, posiblemente debida a la liberación de diversos factores y citocinas por las células transplantadas.



## 5. CLONES DE h\_ASC PRESENTAN HETEROGENEIDAD EN LA SECRECIÓN DE CITOCINAS.

Las células madre mesenquimales además de poseer la habilidad de diferenciar hacia diferentes linajes celulares, también tienen la capacidad de producir gran variedad de factores de crecimiento y citocinas (Haynesworth y col., 1996), los cuales pueden tener efectos autocrinos y paracrinos. Estos factores secretados por las MSC podrían actuar en la reparación de tejidos dañados modulando la respuesta inmune, inhibiendo la fibrosis y apoptosis, incrementando la angiogénesis o estimulando la mitosis y diferenciación. Las características inmunobiológicas únicas que poseen las MSC, les confieren un gran potencial en aplicaciones clínicas, jugando un papel importante como inmunomoduladores, reduciendo la inflamación y alterando tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. Concretamente, las MSC pueden alterar el perfil de secreción de citocinas de las células dendríticas (DC), de las células T nativas y efectoras (Th1 y Th2) y de las células asesinas naturales (NK), induciendo un fenotipo más anti-inflamatorio o tolerante. A pesar de ser bien conocidos estos efectos inmunomoduladores, los mecanismos de acción todavía no están muy claros, pero parece que es necesaria la producción de distintos factores solubles y el contacto directo célula-célula (English y col., 2009). Aunque existen discrepancias en los distintos trabajos en cuanto a los factores solubles que producen las MSC y sobre la necesidad del contacto celular, éstas pueden deberse a las distintas condiciones experimentales o al distinto origen de las células.

Se sabe que la producción de ciertos factores solubles por parte de las MSC puede modular la actividad de las células del sistema inmune, por ejemplo la producción de IL-6 juega un papel importante en la retención del estado inmaduro de las DC (Djouad y col., 2007), lo que conduce indirectamente a la supresión de la actividad de las células T. Las MSC también pueden inhibir directamente la proliferación de células T a través de la producción de ciertos factores como IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$  (Tse y col., 2003; Klyushnenkova y col., 2005). Pero también pueden ejercer este efecto inmunomodulador por mediación de otras células, por ejemplo a través de la interacción con monocitos de la sangre, los cuales hacen que las MSC activen la secreción de diversas moléculas inhibiendo la activación de los linfocitos T (Groh y col., 2005). Esta

comunicación entre monocitos y MSC parece ser independiente del contacto celular y puede estar mediada por factores como IL-1 $\beta$ .

En este trabajo se ha analizado la secreción de distintas citocinas en cinco de los clones aislados, tres de ellos procedentes de un donante (1.7, 1.10 y 1.22) y los otros dos de otro donante (3.5 y 3.10). Los resultados muestran que existe cierta heterogeneidad en su secreción en cuanto a la naturaleza de las citocinas, a la cantidad que secretan y a la respuesta frente a estímulos (LPS y PMA). Por tanto, este estudio revela la existencia de subpoblaciones con distinto perfil de secreción de citocinas dentro de una misma población celular. Este es un aspecto importante y novedoso que hay que tener en cuenta para posibles aplicaciones clínicas, ya que la selección clonal podría proporcionar poblaciones celulares con distinta capacidad inmunomoduladora y anti-inflamatoria. Aunque para confirmar esta idea deben llevarse a cabo nuevos trabajos analizando en mayor profundidad esta posible variabilidad en la capacidad inmunomoduladora. Con esta finalidad, se han iniciado nuevos ensayos en los que se cultivarán estos 5 clones junto con distintas poblaciones leucocitarias. Dichos cocultivos servirán para analizar si estos clones ejercen efectos distintos en cuanto a la capacidad de activación, proliferación y secreción de citocinas en las distintas poblaciones de linfocitos.

Además de los efectos directos sobre células del sistema inmune anteriormente descritos, parece que las MSC también tienen un efecto paracrino sobre otras células del organismo, protegiéndolas de la respuesta inmune. Recientemente se ha especulado sobre la implicación de las ASC en cáncer (Razmkhah y col., 2011). Parece que las ASC procedentes de tejidos con cáncer de mama secretan IL-4, IL-10, IL-8 y TGF- $\beta$ 1, entre otros factores, protegiendo a las células cancerosas de la respuesta inmune, promoviendo una respuesta anti-inflamatoria y favoreciendo el crecimiento del tumor. Sin embargo, deben llevarse a cabo nuevas investigaciones para verificar si la supresión de la respuesta inmune inducida por las ASC es o no independiente de la presencia de células tumorales.

Aunque los mecanismos implicados en la protección de distintos tejidos frente a la respuesta inmune no son totalmente conocidos, las MSC están siendo utilizadas en gran variedad de estudios *in vivo* para el tratamiento de enfermedades autoinmunes,

como la enfermedad de injerto contra huésped (Le Blanc y col., 2004; Yanez y col., 2006), artritis reumatoide (Augello y col., 2007), encefalomiелitis autoinmune (Zappia y col., 2005) o diabetes (Lee y col., 2006). Debido a la experiencia que nuestro grupo posee en el campo de la diabetes, una vez hayan concluido los experimentos con cocultivos y a la luz de los resultados que obtengamos, se realizarán ensayos en modelos animales de diabetes con distintos clones para evaluar si existen diferencias *in vivo* en su potencial inmunomodulador y anti-inflamatorio. En este sentido, se sabe que la reducción de la activación de células T de memoria, junto con el aumento de la proporción de células T reguladoras, es importante para la supervivencia de islotes transplantados en ratón (Xia y col., 2010). Por estos motivos pensamos que las ASC, a través de la modulación de las células T, podrían tener un papel importante en la terapia contra la diabetes.

La diabetes tipo 1 suele estar causada por la destrucción autoinmune, de las células  $\beta$  pancreáticas (mediada por linfocitos T), mientras que en la diabetes tipo 2 se dan procesos inflamatorios que afectan a la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ . Por estos motivos pensamos que las MSC pueden tener un gran potencial en la terapia celular contra la diabetes, actuando a través de varios mecanismos, como por ejemplo: 1) modulando las respuesta inmune directamente a través de la secreción de distintas citocinas y controlando así la células T autoreactivas, 2) indirectamente regulando la función de las células dendríticas, 3) ejerciendo un efecto anti-inflamatorio, a través de la secreción de distintos factores solubles, protegiendo los tejidos dañados, y 4) por su capacidad de diferenciar o estimular la diferenciación a células  $\beta$  en progenitores pancreáticos.

En los últimos años se ha sugerido la idea, aunque con cierta controversia, de que las MSC puedan promover la regeneración pancreática. Varios trabajos han mostrado evidencias sobre la capacidad de diferenciación *in vivo* de BMSC en células  $\beta$  pancreáticas (Ianus y col., 2003; Choi y col., 2003). Por el contrario, otros estudios indican que no existen evidencias de esta transdiferenciación (Lechner y col., 2004; Taneera y col., 2006). También se ha postulado la idea de que no sean estas células las que diferencien, sino que actúen indirectamente creando un ambiente adecuado para una regeneración endógena del tejido pancreático dañado (Hess y col., 2003), favoreciendo que, por ejemplo, células endoteliales adquieran un fenotipo pancreático. Sin embargo,

estudios recientes muestran que distintos tipos de células madre mesenquimales pueden diferenciar en células productoras de insulina *in vitro*, modificando las condiciones de cultivo o mediante manipulación génica (Chen y col., 2004; Wu y col., 2007; Moriscot y col., 2005; Li y col., 2007; Timper y col., 2006). Aunque esta capacidad de diferenciación también es discutida, ya que en algunos casos no se aportan suficientes datos sobre aspectos concernientes al fenotipo y función de la célula diferenciada.

En resumen, hasta la fecha numerosos trabajos han aportado datos, *in vitro* e *in vivo*, sobre las propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales y sobre su potencial para diferenciar hacia células productoras de insulina. Todos estos estudios muestran que estas células pueden proporcionar una nueva estrategia para el tratamiento de la diabetes, la cual puede ser abordada desde diferentes vías, aprovechando su capacidad de regular la respuesta inmune y anti-inflamatoria o a través de su potencial de diferenciación hacia células productoras de insulina.







*CONCLUSIONES*

- 1.- Células madre adultas multipotentes pueden ser aisladas de lipoaspirados humanos.
- 2.- La selección clonal en células madre mesenquimales aisladas de lipoaspirados humanos permite obtener subpoblaciones con distinto perfil de expresión génica y diferente plasticidad, muestra de la heterogeneidad celular presente en los cultivos de estas células recién aisladas.
- 3.- El análisis por RT-PCR de genes característicos del estado indiferenciado y de pluripotencialidad no aporta datos concluyentes sobre la correlación entre expresión génica y capacidad de diferenciación hacia distintos linajes.
- 4.- De igual forma, el análisis por RT-PCR (convencional o cuantitativa) de marcadores osteogénicos no es la mejor forma de analizar el potencial de diferenciación hacia este linaje.
- 5.- La plasticidad hacia linaje osteogénico debe ser evaluada en base al análisis de características fenotípicas y funcionales, como la orientación de las fibras de colágeno, la formación de lagunas o calvas en los cultivos y/o la acumulación de depósitos minerales.
- 6.- Los clones celulares aislados de distintos donantes y analizados mediante pruebas funcionales muestran diferente capacidad de diferenciación osteogénica, lo que indica que distintos precursores mesenquimales con diferente capacidad de regeneración ósea pueden ser aislados *in vitro*.
- 7.- Los distintos clones aislados muestran también diferente capacidad de diferenciación hacia linaje adipogénico, pudiendo depender del estado, condición o edad del donante.
- 8.- La inducción hacia linaje neurogénico revela la capacidad de adquirir fenotipos neuronales en todos los clones, mostrando prolongaciones citoplasmáticas que les confieren una morfología estrellada o piramidal similar a la que presentan neuronas maduras.

- 9.- Tanto las células diferenciadas como las control muestran expresión de marcadores neuronales, ya sea por RT-PCR o por inmunofluorescencia. Además en las pruebas funcionales realizadas, las células diferenciadas y las control muestran similares respuestas intracelulares a calcio cuando son estimuladas con distintos factores, lo que pone en duda que los cambios morfológicos observados sean consecuencia de una verdadera diferenciación.
- 10.- Las células madre mesenquimales se caracterizan, además de por su plasticidad, por poseer la capacidad de producir gran variedad de factores de crecimiento y citocinas. Este estudio ha revelado la existencia de clones con distinto perfil de secreción de citocinas, lo que podría proporcionar poblaciones celulares con distinta capacidad inmunomoduladora y anti-inflamatoria.





*BIBLIOGRAFÍA*

**Abdi, R., Fiorina, P., Adra, C. N., Atkinson, M., Sayegh, M. H. (2008).** Immunomodulation by mesenchymal stem cells: A potential therapeutic strategy for type I diabetes. *Diabetes*, 57: 1759-1767.

**Aggarwal, S., Pittenger, M. F. (2005).** Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105: 1815-1822.

**Anderson, D. J., Gage, F. H., Weissman, I. L. (2001).** Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.*, 7: 393-395.

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

**Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Cancedda, R., Pennesi, G. (2007).** Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 56: 1175-1186.

**Aurich, I., Mueller, L. P., Aurich, H., Luetzkendorf, J., Tisljar, K., Dollinger, M. M., Schormann, W., Walldorf, J., Hengstler, J. G., Fleig, W. E., Christ, B. (2007).** Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut*, 56: 405-415.

**Axelrod, H. R. (1984).** Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique. *Dev. Biol.*, 101: 225-228.

**Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H., Ochiya, T. (2007).** Adipose tissue derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46: 219-228.

**Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000).** Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 18: 767-811.

**Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., Haynesworth, S., Zaia, J. (2001).** The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289: 519-524.

**Boiani, M., Scholer, H. R. (2005).** Regulatory networks in embryo derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6: 872-884.

**Bruder, S. P., Jaiswal, N., Haynesworth, S. E. (1997).** Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.*, 64: 278-294.

**Bruder, S. P., Horowitz, M. C., Mosca, J. D., Haynesworth, S. E. (1997).** Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*, 21: 225-235.

**Bruder, S. P., Ricalton, N. S., Boynton, R. E., Connolly, T. J., Jaiswal, N., Zaia, J., Barry, F. P. (1998).** Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J. Bone Mineral Res.*, 13: 655-663.

**Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S., Baer, P. (2005).** Epithelial differentiation of human adipose tissue derived adult stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330: 142-150.

**Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennet, P. R., Bellantuono, I., Fisk, N. M. (2001).** Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood*, 98: 2396-2402.

**Chen, L. B., Jiang, X. B., Yang, L. (2004).** Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta cells. *World J. Gastroenterol.*, 10: 3016-3020.

**Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F., Avioli, L. V. (1994).** Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 134: 277-286.

**Chichester, C. O., Fernández, M., Minguell, J. J. (1993).** Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblast. *Cell Adhes. Commun.*, 1: 93-99.

**Cho, H. H., Kim, Y. J., Kim, S. J., Kim, J. H., Bae, Y. C., Ba, B., Jung, J. S. (2006).** Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng.*, 12: 111-121.

**Choi, J. B., Uchino, H., Azuma, K., Iwashita, N., Tanaka, Y., Mochizuki, H., Migita, M., Shimada, T., Kawamori, R., Watada, H. (2003).** Little evidence of transdifferentiation of bone marrow derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetología*, 46: 1366-1374.

**Conget, P. A., Minguell, J. J. (1999).** Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.*, 181: 67-73.

**Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Riso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistola, V., Uccelli, A. (2006).** Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107: 367-372.

**De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., Luyten, F. P. (2001).** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human sinovial membrane. *Arth. Rheum.*, 44: 1928-1942.

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

**Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., Prockop, D. (2001).** In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282: 148-152.

**Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A. M. (2002).** Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. *Blood*, 99: 3838-3843.

**Di Rocco, G., Iachininoto, M. G., Tritarelli, A., Straino, S., Zacheo, A., Germani, A., Crea, F., Capogrossi, M. C. (2006).** Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J. Cell. Sci.*, 119: 2945-2952.

**Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., Prockop, D. J. (1999).** Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.*, 107: 275-281.

**Djouad, F., Ponce, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noel, D., Jorgensen, C. (2003).** Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102: 3837-3844.

**Djouad, F., Charbonnier, L., Bouffi, C., Louis-Ponce, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., Noel, D. (2007).** Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin 6 dependent mechanism. *Stem Cells*, 25: 2025-2032.

**Donath, M. Y., Schumann, D. M., Faulenbach, M., Ellingsgaard, H., Perren, A., Ehses, J. A. (2008).** Islet inflammation in type 2 diabetes: From metabolic stress to therapy. *Diabetes Care*, 31: S161-S164.

**English, K., Ryan, J. M., Tobin, L., Murphy, M. J., Barry, F. P., Mahon, B. P. (2009).** Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non



redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 156: 149-160.

**Erickson, G. R., Gimble, J. M., Franklin, D. M., Rice, H. E., Awad, H., Guilak, F. (2002).** Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290: 763-769.

**Evans, M. J., Kaufman, M. H. (1981).** Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.

**Fang, B., Song, Y. P., Liao, L. M., Han, Q., Zhao, R. C. (2006).** Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.*, 38: 389-390.

**Fraser, J. K., Schreiber, R., Strem, B., Zhu, M., Alfonso, Z., Wulur, I., Hedrick, M. H. (2006).** Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 3(S1): 33-37.

**Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I., Petrakova, K. V. (1966).** Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 16: 381-390.

**Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., Kulagina, N. N. (1976).** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.*, 4: 267-274.

**Galmiche, M. C., Koteliansky, V. E., Briere, J., Herve, P., Charbord, P. (1993).** Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 82: 66-76.

**García-Olmo, D., García-Arranz, M., Herreros, D. (2008).** Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert. Opin. Biol., Ther.*, 8: 1417-1423.

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

**Gimble, J. M., Pietrangeli, C., Henley, A., Dorheim, M. A., Silver, J., Namen, A., Takeichi, M., Goridis, C., Kincade, P. W. (1989).** Characterization of murine bone marrow and spleen-derived stromal cells: Analysis of leukocyte marker and growth factor mRNA transcript levels. *Blood*, 74: 303-311.

**Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W., Dazzi, F. (2005).** Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105: 2821-2827.

**González, M. A., González-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., Delgado, M. (2009).** Adipose derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*, 136: 978-89.

**González-Rey, E., González, M. A., Varela, N., O'Valle, F., Hernández-Cortés, P., Rico, L., Büscher, D., Delgado, M. (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: 241-248.

**Groh, M. E., Maitra, B., Szekely, E., Koc, O. N. (2005).** Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp. Hematol.*, 33: 928-934.

**Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., Gimble, J. M. (2001).** Surface protein characterization of human adipose tissue derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.*, 189: 54-63.

**Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortessidis, A., Simmons, P. J. (2003).** Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.*, 116: 1827-1835.

**Guilak, F., Lott, K. E., Awad, H. A., Cao, Q., Hicok, K. C., Fermor, B., Gimble, J. M. (2006).** Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J. Cell. Physiol.*, 206: 229-237.

**Hall, P. A., Watt, F. M. (1989).** Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, 106: 619-633.

**Halvorsen, Y. D., Franklin, D., Bond, A. L., Hitt, D. C., Auchter, C., Boskey, A. L., Paschalis, E. P., Wilkison, W. O., Gimble, J. M. (2001).** Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue derived stromal cells. *Tissue Eng.*, 7: 729-741.

**Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., Pfeiffer, E. F. (1989).** Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J. Clin. Invest.*, 84: 1663-1670.

**Haynesworth, S. E., Baber, M. A., Caplan, A. I. (1992).** Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13: 69-80.

**Haynesworth, S. E., Baber, M. A., Caplan, A. I. (1996).** Cytokine expression by human marrow derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J. Cell. Physiol.*, 166: 585-592.

**Hess, D., Li, L., Martin, M., Sakano, S., Hill, D., Strutt, B., Thyssen, S., Gray, D. A., Bhatia, M. (2003).** Bone marrow derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat. Biotechnol.*, 21: 763-770.

**Hicok, K. C., Du Laney, T. V., Zhou, Y. S., Halvorsen, Y. D., Hitt, D. C., Cooper, L. F., Gimble, J. M. (2004).** Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng.*, 10: 371-80.

**Hogan, B., Fellows, M., Avner, P., Jacob, F. (1977).** Isolation of human teratoma cell line which expresses F9 antigen. *Nature*, 270: 515-518.

**Huang, J. I., Zuk, P. A., Jones, N. F., Zhu, M., Lorenz, H. P., Hedrick, M. H., Benhaim, P. (2004).** Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.*, 113: 585-594.

**Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D., Hussain, M. A. (2003).** In vivo derivation of glucose competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.*, 111: 843-850.

**Ilancheran, S., Moodley, Y., Manuelpillai, U. (2009).** Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair. *Placenta*, 30: 2-10.

**Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., Bruder, S. P. (1997).** Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.*, 64: 295-312.

**Jiang, X. X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S. X., Wu, Y., Yu, X. D., Mao, N. (2005).** Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105: 4120-4126.

**Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., Yoo, J. U. (1998).** In vitro chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.*, 238: 265-272.

**Kahn, B. W., Ephrussi, B. (1970).** Developmental potentialities of clonal in vitro culture of mouse testicular teratoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 44: 1015-1029.

**Kang, S. K., Lee, D. H., Bae, Y. C., Kim, H. K., Baik, S. Y., Jung, J. S. (2003).** Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.*, 183: 355-66.

**Karnieli, O., Izhar-Prato, Y., Bulvik, S., Efrat, S. (2007).** Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells*, 25: 2837-2844.

**Kassem, M., Ankersen, L., Eriksen, E. F., Clark, B. F., Rattan, S. I. (1997).** Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporos. Int.*, 7: 514-524.

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

**Kim, B. J., Seo, J. H., Bubbien, J. K., Oh, Y. S. (2002).** Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport*, 13: 1185-1188.

**Klyushnenkova, E., Mosca, J. D., Zernetkina, V., Majumdar, M. K., Beggs, K. J., Simonetti, D. W., Deans, R. J., McIntosh, K. R. (2005).** T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J. Biomed. Sci.*, 12: 47-57.

**Kompisch, K. M., Lange, C., Steinemann, D., Skawran, B., Schlegelberger, B., Muller, R., Schumacher, U. (2010).** Neurogenic transdifferentiation of human adipose derived stem cells? A critical protocol reevaluation with special emphasis on cell proliferation and cell cycle alterations. *Histochem. Cell Biol.*, 134: 453-468.

**Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. (2006).** Role of IFN- $\gamma$  in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24: 386-398.

**Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., Robey, P. G. (1997).** Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J. Bone Miner. Res.*, 12: 1335-1347.

**Landis, W. J., Song, M. J., Leith, A., McEwen, L., McEwen, B. F. (1993).** Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. *J. Struct. Biol.*, 110: 39–54.

**Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringden, O. (2003).** HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.*, 31: 890-896.

**Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S. E., Ringden, O. (2003).** Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.*, 57: 11-20.

**Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., Ringen, O. (2004).** Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363: 1439-1441.

**Lechner, A., Yang, Y. G., Blacken, R. A., Wang, L., Nolan, A. L., Habener, J. F. (2004).** No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta cells in vivo. *Diabetes*, 53: 616-623.

**Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-Peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., Chen, J. R., Chen, Y. P., Lee, O. K. (2004).** In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 40: 1275-1284.

**Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. N., Lee, K. D., Hsieh, S. L., Chen, T. H. (2004).** Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cordon blood. *Blood*, 103: 1669-1675.

**Lee, R. H., Seo, M. J., Reger, R. L., Spees, J. L., Pulin, A. A., Olson, S. D., Prockop, D. J. (2006).** Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 17438-17443.

**Lennon, D.P., Haynesworth, S. E., Bruder, S. P., Jaiswal, N., Caplan, A. I. (1996).** Development of a serum screen for mesenchymal progenitor cells from bone marrow. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 32: 602-611.

**Li, Y., Zhang, R., Qiao, H., Zhang, H., Wang, Y., Yuan, H., Liu, Q., Liu, D., Chen, L., Pei, X. (2007).** Generation of insulin producing cells from PDX-1 gene modified human mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 36-44.

**Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25: 402-408.

**Lu, P., Blesch, A., Tuszynski, M. H. (2004).** Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.*, 77: 174-191.

**Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Mosca, J. D., Moorman, M., Gerson, S. L. (1998).** Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.*, 176: 57-66.

**Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., Mosca, J. D. (2003).** Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.*, 10: 228-241.

**Mareddy, S., Crawford, R., Brooke, G., Xiao, Y. (2007).** Clonal isolation and characterization of bone marrow stromal cells from patients with osteoarthritis. *Tissue Eng.*, 13: 819-829.

**Mareddy, S., Dhaliwal, N., Crawford, R., Wiao, Y. (2010).** Stem cell related gene expression in clonal populations of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Tissue Eng.*, 16: 749-758.

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

**Menicanin, D., Bartold, P. M., Zannettino, A. C., Gronthos, S. (2009).** Genomic profiling of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.*, 5: 36-50.

**Minguell, J. J., Erices, A., Conget, P. (2001).** Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 226: 507-520.

**Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., Shi, S. (2003).** SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100: 5807-5812.

**Mizuno, H., Zuk, P. A., Zhu, M., Lorenz, H. P., Benhaim, P., Hedrick, M. H. (2002).** Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.*, 109: 199-209.

**Mochida, Y., Parisuthiman, D., Pornprasertsuk-Damrongsri, S., Atsawasuwana, P., Sricholpech, M., Boskey, A. L., Yamauchi, M. (2009).** Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biol.*, 28: 44-52.

**Moore, K. A., Lemischka, I. R. (2006).** Stem cells and their niches. *Science*, 311: 1880-1885.

**Moriscot, C., De Fraipont, F., Richard, M. J., Marchand, M., Savatier, P., Bosco, D., Favrot, M., Benhamou, P. Y. (2005).** Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells*, 23: 594-603.

**Nadal, A., Fuentes, E., Pastor, J., McNaughton, P. A. (1995).** Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 1426-1430.

**Nadal, A., Fuentes, E., Pastor, J., McNaughton, P. A. (1997).** Plasma albumin induces calcium waves in rat cortical astrocytes. *Glia*, 19: 343-351.



**Nathan S., Das De, S., Thambyah, A., Fen, C., Goh, J., Lee, E. H. (2003).** Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng.*, 9: 733-744.

**Nauta, A. J., Fibbe, W. E. (2009).** Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110: 3499-3506.

**Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A., Fischer, I. (2004).** Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.*, 77: 192-204.

**Otto, T. C., Lane, M. D. (2005).** Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 40: 229-242.

**Papamichail, M., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N. (2004).** Natural killer lymphocytes: biology, development and function. *Cancer Immunol. Immunother.*, 53: 176-186.

**Paredes, B., Santana, A., Arribas, M. I., Vicente-Salar, N., De Aza, P. N., Roche, E., Such, J., Reig, J. A. (2010).** Phenotypic differences during the osteogenic differentiation of single cell derived clones isolated from human lipoaspirates. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 8.

**Phinney, D. G., Koopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., Prockop, D. J. (1999).** Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.*, 75: 424-436.

**Pierantozzi, E., Gava, B., Manini, I., Roviello, F., Marotta, G., Chiavarelli, M., Sorrentino, V. (2010).** Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of Nanog but not of Oct-4 and Sox-2. *Stem Cells Dev.*, 29.

**Pittenger, M. F. (1998).** Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. US Patent 5, 827, 740.

**Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., Marshak, D. R. (1999).** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147.

**Planat-Benard, V., Menard, C., Andre, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J. M., Penicaud, L., Casteilla, L. (2004).** Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ. Res.*, 94: 223-229.

**Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Penicaud, L., Casteilla, L. (2004).** Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109: 656-663.

**Potten, C. S., Loeffler, M. (1990).** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. *Development*, 110: 1001-1020.

**Prockop, D. J. (1997).** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71-74.

**Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., Taureau, C., Cousin, B., Abbal, M., Laharrague, P., Penicaud, L., Casteilla, L., Blancher, A. (2005).** Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.*, 129: 118-129.

**Razmkhah, M., Jaberipour, M., Erfani, N., Habibagahi, M., Talei, A. R., Ghaderi, A. (2011).** Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: do they protect breast cancer cells from the immune response? *Cell Immunol.*, 266: 116-122.

**Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., Pell, C. L., Johnstone, B. H., Considine, R. V., March, K. L.**

(2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109: 1292-1298.

Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'Huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A. I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A. B., Shi, Y. (2009). Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell mediated immunosuppression. *Stem Cells*, 27: 1954-1962.

Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L., Donovan, P. J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359: 550-551.

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.*, 18: 399-404.

Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., Niece, R., Ancans, J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.*, 5: 378-386.

Roche, S., Richard, M. J., Favrot, M. C. (2007). Oct-4, Rex-1, and Gata-4 expression in human MSC increase the differentiation efficiency but not hTERT expression. *J. Cell Biochem.*, 101: 271-280.

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

Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M. C., de la Fuente, R., Cigudosa, J. C., Lloyd, A. C., Bernad, A. (2005). Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.*, 65: 3035-3039.

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

**Sánchez-Caro, J., Abellán, F. (2007).** Investigación biomédica en España: Aspectos bioéticos, jurídicos y científicos. *Ed. Comares*.

**Sánchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R., Sanberg, P. R. (2000).** Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.*, 164: 247-256.

**Schofield, R. (1978).** The relationship between the spleen colony forming cell and the hematopoietic stem cell. *Blood cells*, 4: 7-25.

**Schuldt, A., Rosen, M., Gaudette, G., Cohen, I. (2008).** Repairing damaged myocardium: evaluating cells used for cardiac regeneration. *Curr. Treat. Opinion. Cardiovasc. Med.*, 10: 59-72.

**Seo, M. J., Suh, S. Y., Bae, Y. C., Jung, J. S. (2005).** Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328: 258-264.

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

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

**Shapiro, F. (2008).** Bone development and its relation to fracture repair. The role

of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur. Cell Mater.*, 15: 53–76.

**Simmons, P. J., Torok-Storb, B. (1991).** Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78: 55-62.

**Song, L., Webb, N. E., Song, Y., Tuan, R. S. (2006).** Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells*, 24: 1707-1718.

**Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., Papamichail, M. (2008).** Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24: 74-85.

**Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C., Moretta, L. (2006).** Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2 induce Nk cell proliferation. *Blood*, 107: 1484-1490.

**Stosich, M. S., Bastian, B., Marion, N. W., Clark, P. A., Reilly, G., Mao, J. J. (2007).** Vascularized adipose tissue grafts from human mesenchymal stem cells with bioactive cues and microchannel conduits. *Tissue Eng.*, 13: 2881-2890.

**Sun, Y., Chen, L., Hou, X. G., Hou, W. K., Dong, J. J., Sun, L., Tang, K. X., Wang, B., Song, J., Li, H., Wang, K. X. (2007).** Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin. Med. J.*, 120: 771-776.

**Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonaskis, A. K., Nagy, A., Rossant, J. (1998).** Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, 282: 2072-2075.

**Taneera, J., Rosengren, A., Renstrom, E., Nygren, J. M., Serup, P., Rorsman, P., Jacobsen, S. E. (2006).** Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic beta cell fate. *Diabetes*, 55: 290-296

**Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E., Scott, E. W. (2002).** Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416: 542-545.

**Tholpady, S. S., Llull, R., Ogle, R. C., Rubin, J. P., Futrell, J. W., Katz, A. J. (2006).** Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clin. Plast. Surg.*, 33: 55-62.

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

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

**Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J., Hwang, S. M. (2004).** Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.*, 19: 1450-1456.

**Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., Guinan, E. C. (2003).** Suppression of allogenic T cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 15: 389-397.

**Wakitani, S., Saito, T., Caplan, A. I. (1995).** Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18: 1417-1426.

**Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., Black, I. B. (2000).** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neuroscience Res.*, 61: 364-370.

**Wu, X. H., Liu, C. P., Xu, K. F., Mao, X. D., Zhu, J., Jiang, J. J., Cui, D., Zhang, M., Xu, Y., Liu, C. (2007).** Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein

transplantation of islet like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J. Gastroenterol.*, 13: 3342-3349.

**Xia, J., Chen, J., Shao, W., Lan, T., Wang, Y., Xie, B., Thorlacijs, H., Tian, F., Huang, R., Qi, Z. (2010).** Suppressing memory T cell activation induces islet allograft tolerance in alloantigen-primed mice. *Transpl. Int.*, 23: 1154-1163.

**Yanez, R., Lamana, M. L., Garcia-Castro, J., Colmenero, I., Ramirez, M., Bueren, J. A. (2006).** Adipose tissue derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells Dev.*, 24: 2581-2591.

**Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P., Smith, A. G. (2002).** Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416: 545-548.

**Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., Smith, A. (2003).** Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotech.*, 21: 183-186.

**Young, R. G., Butler, D. L., Weber, W., Caplan, A. I., Gordon, S. L., Fink, D. J. (1998).** Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop. Res.*, 16: 406-413.

**Zaragosi, L. E., Ailhaud, G., Dani, C. (2006).** Autocrine FGF2 signalling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*, 24: 2412-2419.

**Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G., Uccelli, A. (2005).** Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106: 1755-1761.

**Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J. I., Futrell, W. J., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., Hedrick, M. H. (2001).** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 7: 211-226.

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

**Zurita, M., Vaquero, J. (2006).** Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci. Lett.*, 402: 51-56.

**Zurita, M., Vaquero, J., Bonilla, C., Santos, M., De haro, J., Oya, S., Aguayo, C. (2008).** Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation*, 86: 845-853.

