



Mesenquimales Estromales de Tejido Adiposo de Alta Capacidad Proliferativa: Caracterización y Aplicación a Terapia Celular

Elisabet Aguilar Bohórquez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Mesenquimales Estromales de Tejido Adiposo de Alta
Capacidad Proliferativa:

Caracterización y Aplicación a Terapia Celular

Elisabet Aguilar Bohórquez

2012

Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Memoria presentada por la Licenciada en Biología Elisabet Aguilar Bohórquez, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona, por el programa de Doctorado en Biomedicina del departamento de Bioquímica Molecular (Bienio 2005-2009)

La presente Tesis doctoral: “Mesenquimales Estromales de Tejido Adiposo de Alta Capacidad Proliferativa: Caracterización y Aplicación a Terapia Celular”, ha sido realizada en el Centro de Investigación Cardiovascular (Instituto Catalán de Ciencias Cardiovasculares-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Hospital de la Santa Cruz y San Pau) bajo la dirección del Dr. Jerónimo Blanco Fernández.

La Doctoranda

Elisabet Aguilar Bohórquez

El Director:

Jerónimo Blanco Fernández



CONTENIDO

CONTENIDO	5
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	17
I. TERAPIA CELULAR	19
1. Medicina Regenerativa	19
2. Terapia Celular: Definición.....	20
3. Reseñas Históricas	21
4. Situación Actual	22
5. Tipos Celulares Empleados en Terapia Celular	25
5.1 Autólogas o Alogénicas.....	25
5.2. Embrionarias, iPSCs o Adultas	26
II. CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES	29
1. Definición y fuentes	29
2. Características.....	32
2.1 Capacidad de expansión <i>in vitro</i>	32
2.2 Multipotencialidad.....	33
2.3 Capacidad de Migración.....	36
2.4 Estabilidad Genómica	37
2.5 Efectos Paracrinos	38
3. Usos Terapéuticos de las MSC de tejido adiposo (AMSC)	40
III. TERAPIAS PARA ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	43
1. Tipo de Células empleadas	45
2. Método de administración de las células	47
IV. MONITORIZACIÓN DE CÉLULAS <i>IN VIVO</i>	49
1. Bioluminiscencia: Técnica Óptica de Imagen	51
1.1 Tipos de Luciferasas	52
1.2 Ventajas e inconvenientes de las luciferasas	53
1.3 Uso de las luciferasas en modelos de terapia celular.....	54
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
I. EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	63
1. Tipos celulares	63
1.1 293T	63
1.2 Células madre adulta mesenquimales derivadas de tejido adiposo (hAMSC)	63
1.3 U87 MG	64
1.4 PC3.....	64
2. Condiciones y medios de cultivo	64
3. Estudio de diferenciación <i>in vitro</i>	65
3.1 Diferenciación adipogénica	65
3.2 Diferenciación osteogénica	66
5. Determinación de la entrada en senescencia	67
6. Análisis de los marcadores de superficie por citometría de flujo	67
7. Marcaje celular	68
7.1 Vectores	68
7.2 Producción de partículas víricas	69

7.3 Titulación de partículas víricas	70
7.4 Transducción celular	71
8. Ensayo de formación tubulogénica <i>in vitro</i> en Matrigel	72
9. Extracción de ADN genómico y ARN	73
10. Hibridación Comparativa de Genoma (CGH).....	73
11. Microarrays y análisis de datos	74
12. PCR a tiempo real.....	75
13. Ensayo de viabilidad.....	77
II. EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i>	78
1. Ratones	78
1.1 Ratones SCID.....	78
2. Implantación de células humanas hAMSC y FP-MSC en ratones SCID	78
3. Implantación de células humanas en el cerebro de ratones SCID	79
4. Establecimiento de gliomas	80
5. Inyecciones mixtas de células tumorales y hAMSC/FP-MSC en ratón.....	80
6. Modelo de tumores ectópico de PC3 en ratones SCID	80
7. Modelo <i>in vivo</i> de infarto de miocardio	80
7.1 Procedimiento quirúrgico en modelo de infarto.....	81
7.2 Cirugía aguda terminal	84
III. SISTEMA DE ANALISIS	86
1. Imagen por bioluminiscencia (BLI)	86
1.1 Cuantificación de fotones a partir de las imágenes	86
2. Análisis funcional: Ecocardiograma	87
3. Inmunofluorescencia	88
4. Análisis morfométrico: Tricrómica de Masson	89
4.1 Tinción Tricrómica de Masson	90
5. Densidad vascular: Tinción con Lectina GSLIB4	91
RESULTADOS.....	95
I. FP-MSC: CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE ALTA CAPACIDAD PROLIFERATIVA.....	97
1. Comparación de la capacidad proliferativa y senescencia de las hAMSC y FP-MSC	97
2. Morfología y capacidad de diferenciación.....	99
3. Marcadores de superficie	100
4. Tumorigenicidad	103
5. Perfil de expresión génica	107
6. Origen del fenotipo FP-MSC: SELECCIÓN O INDUCCIÓN	112
7. Reversibilidad del fenotipo FP-MSC	115
8. Capacidad de formar estructuras tipo vascular <i>in vitro</i>	119
II. APLICACIÓN DE LAS FP-MSC PARA TERAPIA CELULAR	121
1. Tratamiento contra el cáncer	121
1.1 Modelo de glioma en ratones SCID tratado con Timidín-Kinasa (TK)	122
1.2 Modelo de tumor de próstata PC3 ectópico en ratón SCID tratados con CDUPRT.	124
2. Regeneración tisular: Modelo de isquemia cardiaca	129
2.1 Estrategia de trabajo	129
2.2 Estudio <i>in vivo</i> por bioluminiscencia	130
2.3 Identificación de las células trasplantadas.....	133

2.4 <i>Función cardiaca</i>	137
DISCUSIÓN	143
CONCLUSIONES	159
APÉNDICES	165
AGRADECIMIENTOS	175
BIBLIOGRAFÍA	181

ABREVIATURAS

5-FC: 5-fluorocitosina

ATCC: *American Type Culture Collection*

BLI: imagen mediada por bioluminiscencia

BMP: proteína morfogenica osea

CCD: *Charged couple device*

CD-UPRT: quimera fusionada de la Cytosina deaminasa y la Uracilo Fosforibosiltransferasa

CGH: Hibridación Comparativa de Genoma

CMV: citomegalovirus

CZN: colenterazina

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: Dulbecco's modified eagle media-high glucose

EGM2: *Endotelial Growth Medium*

FACS: separación de células activada por fluorescencia

FE: Fracción de eyección

FC: *fold change*

FDR: *false discovery rate*

FE: fracción de eyeccion

FP-MSC: células mesenquimales estromales de alta capacidad proliferativa (*fast-proliferating hAMSC*)

GCV: ganciclovir

hAMSC: célula estromal mesenquimal de tejido adiposo

hESC: células madre embionarias humanas

ABREVIATURAS

HLA: agente de histocompatibilidad humana

IAM: infarto agudo de miocardio

ICM: masa celular interna

IGF: factor de crecimiento insulínico, (*insulin-like growth factor*)

IM: intramuscular

IP: intraperitoneal

IPA: *ingenuity pathway analyse*

iPSC: células madre pluripotentes inducidas

ISCT: *International Society for Cellular Therapy*

MI: infarto de miocardio

MOI: multiplicidad de infección

MSC: célula estromal mesenquimal (*mesenchymal stromal cell*)

OCT: *Optimal Cutting Temperature compound*

P/S: penicilina-estreptomicina

PC3: línea celular de cáncer de próstata humano

PD: duplicación poblacional

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, (*platelet-derived growth factor*)

PET: tomografía de emisión de positrones

PFA: paraformaldehído

PHC: *photon counts*

PLuc: *Photinus pyralis*

RLuc: *Renilla reniformis*

SBF: suero bovino fetal

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

TGF β : factor de crecimiento transformante beta, (*transforming growth factor beta*)

TK: timidin kinasa

U87 MG: linea celular de glioma humano

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, (*vascular endothelial growth factor*)

INTRODUCCIÓN

I. TERAPIA CELULAR

1. Medicina Regenerativa

La medicina regenerativa es un campo emergente que se define como cualquier intervención médica destinada a reparar, reemplazar, o restaurar tejidos y órganos del cuerpo humano. Tiene un enfoque interdisciplinar, y abarca áreas como: la ingeniería de tejidos, biología del desarrollo y de las células madre, terapia génica, terapia celular, biomateriales, la nanociencia, bioingeniería y biología química.

Hoy en día, la sustitución o reparación de un órgano o tejido no funcional puede llevarse a cabo mediante diferentes procedimientos, entre los que encontramos: alotrasplante (trasplante de órgano o tejido entre dos individuos de la misma especie), autotrasplante (trasplante de un órgano o tejido del mismo individuo de un lugar a otro), xenotrasplante (trasplante efectuado entre miembros de diferentes especies), o con la ayuda de implantes de materiales biomiméticos. Estos tratamientos presentan ciertas limitaciones; los trasplantes que incorporen un órgano de otro individuo, ya sea de su misma especie o de otra, condicionan al receptor a tomar inmunosupresores de por vida; a esto se le suma otros inconvenientes como son la escasa disponibilidad de órganos y transmisión de patógenos en el caso de los alotrasplantes¹ o las consideraciones éticas en los xenotrasplantes. Los autotrasplantes evitan el rechazo inmunológico, su uso prevalece en cirugía plástica y reconstructora, su principal inconveniente es la disponibilidad de suficiente tejido sano, en estos pacientes². La implantación de materiales biomimético, evita la mayoría de estos inconvenientes. Actualmente, podemos encontrar gran variedad de ejemplos: corazones artificiales³, válvulas de corazón⁴, prótesis de cadera⁵ o implantes de pecho⁶. Aunque estas prótesis tienen un impacto positivo en la sociedad, están sujetas a otro tipo de problemas, posibles fracturas, toxicidad, desgaste e incapacidad de adaptarse con el tiempo a las necesidades del cuerpo.

En los últimos años, el avance en este tipo de intervenciones ha sido notable, y nos ha permitido mejorar la calidad y esperanza de vida. Sin embargo, las limitaciones existentes, principalmente: disponibilidad de órganos y/o tejidos y posibles rechazos inmunológicos; han promovido la emergencia de terapias alternativas con potencial para paliar un número creciente de patologías

2. *Terapia Celular: Definición*

Como ya hemos mencionando anteriormente, la terapia celular es una rama de la medicina regenerativa. Según la ASGCT (*American Society of Gene & Cell Therapy*), se podría definir como la transfusión o el trasplante de células enteras a un paciente para el tratamiento de una enfermedad hereditaria o adquirida. Investigaciones recientes indican que el uso de este tipo de estrategia es prometedor para tratar un amplio abanico de enfermedades humana, muchas de las cuales se pensaba hasta la fecha incurable: diversos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, lesiones en la espina dorsal, diabetes o tratamiento de enfermedades cardiovasculares⁷.

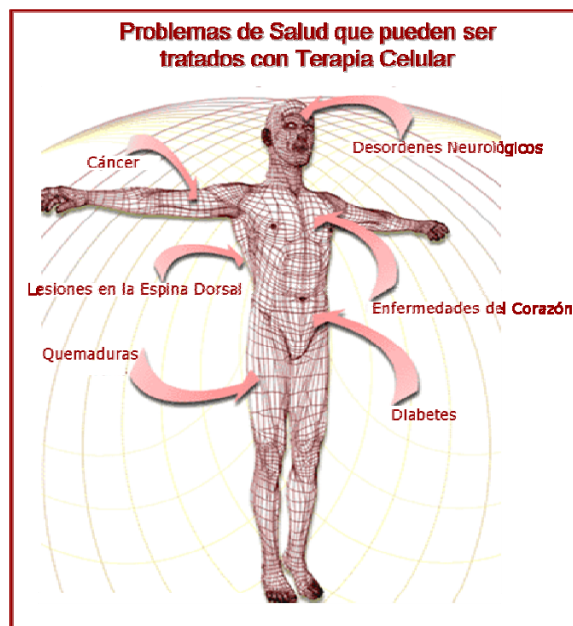


Figura 1: Aplicaciones potenciales de la terapia celular

3. Reseñas Históricas

La utilización de células para tratar enfermedades no es un concepto nuevo. Desde tiempos ancestrales, se han ido utilizando tejidos de origen animal para curar enfermedades humanas, ejemplos de ellos se recogen en el antiquísimo tratado médico egipcio: el papiro de Ebers.

El primer trasplante de célula registrado por la medicina moderna fue una transfusión sanguínea que data de 1667, de perro a humano, llevada a cabo por Jean-Baptiste Denys. Sin embargo, no hubo grandes avances en este tipo de tratamiento hasta después de la primera década del siglo XIX, cuando se identificó la existencia de diferentes grupos sanguíneos, descubrimiento que nos permitió entender la relación entre la muerte del paciente y la incompatibilidad entre donante y receptor. Sin embargo, no fue hasta la década de los 40 del siglo XX, que las transfusiones sanguíneas se convirtieron en una técnica segura y con buenos resultados.

El término actual de terapia celular debe su legitimidad científica a las investigaciones sobre el trasplante de medula ósea. Los primeros indicios de la efectividad de estos procedimientos, derivaron de la observación de ratones irradiados que morían por insuficiencia hematopoyética⁸ y sólo se recuperaban cuando recibían inyecciones de una suspensión celular de un órgano hematopoyético, como podía ser la medula ósea⁹. Pasado los años 50, se realizó el primer trasplante de médula en humanos con éxito; llevado a cabo entre gemelos univitelinos. Los trasplantes de células no alcanzaron un notable progreso hasta que en 1958, Jean Dausset identificara el primer agente de histocompatibilidad humana, HLA. Este tipo de proteína de superficie de la mayoría de las células permite al sistema inmune reconocerlas como endógenas o exógenas, y para en tal caso, eliminarlas. Basados en estos conocimientos en 1973, se concluyó exitosamente el primer trasplante de médula ósea entre personas no emparentadas. A partir de los 90, se produjo una rápida expansión de este tipo de terapias para el tratamiento de inmunodeficiencias y leucemias.

En 1988, se emplearon por primera vez las células de cordón umbilical en una terapia celular: para tratar la anemia de Fanconi en un niño de 6 años, y en 1997 se emplearon, previamente expandidas *ex vivo*, para tratar un adulto con leucemia mieloide crónica.

Otros importantes hitos científicos en 1998 fueron, el desarrolló por James Thompson de la primera línea de células madre embrionarias, a partir de la masa celular interna (ICM) de un embrión en estado de blastocisto; y la obtención de derivados de células germinales procedente del tejido gonadal del feto por John Gearhart . Estas células pluripotentes capaces de generar, bajo los estímulos adecuados, diferentes tipos celulares además de ser inmortales, ofrecían un potencial inmenso como herramienta para medicina regenerativa. Sin embargo, el uso de blastocistos humanos, generalmente procedentes de remanentes de fertilizaciones *in vitro*, despertó una gran controversia ética en la sociedad, propiciando un revés para su posterior desarrollo científico.

Los hitos más recientes han tenido lugar en 2006, cuando el equipo de Shinya Yamanaka demostró la capacidad de generar células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblasto de ratón (iPSCs), y en el 2007, cuando James Thompson y Shinya Yamanaka produjeron iPSCs procedentes de células adulta humanas. Este nuevo tipo celular presenta una versatilidad equivalente al de las células embrionarias, pudiendo dar lugar a cualquier tipo celular, superando además, inconvenientes éticos y problemas de rechazo inmunológico. Con estos descubrimientos se abrió un nuevo campo de investigación en medicina regenerativa.

4. Situación Actual

Actualmente se puede considerar a la terapia celular como una realidad clínica. En las últimas dos o tres décadas, el desarrollo de diversas tecnologías en modelos animales ha culminado en nuevas terapias que están siendo evaluadas en múltiples ensayos clínicos de importantes enfermedades humanas, por ejemplo las de la sangre, cáncer, trastornos cardiovasculares, cegueras y enfermedades congénitas del ojo, diabetes, inmunodeficiencias, enfermedades infecciosas, enfermedades del depósito liposomal, trastornos

músculo-esqueléticos, trastornos neurodegenerativos y del movimiento, o enfermedades respiratorias, entre otras. Aunque en algunas de estas enfermedades, se han observado mejoras prometedoras, en otros ensayos no se han producido los resultados esperados. En todo caso, estos ensayos han permitido un avance en el conocimiento de las complejidades de la terapia celular, útil en futuras investigaciones. Entre los avances más notables en las terapias génica y celular, resaltaremos algunos ejemplos de enfermedades tratadas con terapia celular¹⁰

Enfermedades de la sangre

Los trastornos de la sangre abarcan una amplia variedad de enfermedades incluyendo cáncer, las anemias como la falciforme, la talasemia beta o alfa, y la anemia de Fanconi debidas a mutaciones que afectan al número, función o desarrollo de los glóbulos rojos, las hemofilias, e inmunodeficiencias.

Hoy en día, podemos tratar este tipo de enfermedades mediante la transferencia de médula ósea o células madres hematopoyéticas procedentes de un donante histo-inmunológicamente compatible, para de esta forma, reemplazar los precursores mutados por precursores normales, capaces de repoblar de células rojas normales.

Diabetes tipo I

La diabetes tipo I es una enfermedad autoinmune en la cual el sistema inmunitario reconoce y elimina las células beta productoras de insulina del páncreas. Esta enfermedad puede tratarse desde la vertiente de la terapia génica, introduciendo el gen de la insulina en otro tipo celular (hígado, intestino, o estomago) o por terapia celular, implantación de células madre o células beta pancreáticas productoras de insulina. Hoy en día hay una veintena de ensayos clínicos en curso que transfieren o generan células pancreáticas beta a partir de fuentes como: células pancreáticas beta alogénicas, células madre de cordón umbilical, o mesenquimales derivadas del tejido adiposo o de médula ósea autólogas. En conjunto, estos métodos representan nuevas esperanzas en el tratamiento de esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La terapia celular está avanzando a una velocidad vertiginosa. Durante los últimos 10 años, más de 2500 ensayos se han iniciado, de los cuales más del 50% de ellos se encuentran en fase II o III¹¹. Si suponemos que el 1-2% de ellos tiene éxito (actualmente, la tasa de éxitos en biotecnología es del 5,3%) en 5-10 años el número de terapias con células aumentaría en más de un centenar. Según el análisis de Lee Buckler¹² (marzo, 2011), hoy en día hay unas 275 compañías terapéuticas con unas 240 terapias basadas en células (~77 en fase 1, ~89 en fase 2, ~27 en fase 3 y ~44 ya están disponible en el mercado). En la Tabla 1, se recogen las 10 principales empresas del mundo relacionadas con la medicina regenerativa, de las cuales solo una de las cinco mejores, Carticel de Genzyme que trata la reparación del cartílago de rodilla, emplea células. Sin embargo, cinco de estas diez mejores empresas son de terapia celular (Dermagraft, Apligraf, Carticel, Celution y Osteocel).

Empresa	Nombre comercial	Tipo de Producto	Area Terapéutica	Indicado para	Lanzamiento	Ingresos 2007 (millones de \$)	Crecimiento 2006-2007
Advanced Biohealing	Dermagraft	Células neonatales alogénicas con matriz	Piel	Úlceras de piel en diabéticos	1997	~20	> 10%
Cytori	Celution	Producto a partir de células autólogas	Tejidos Blandos (adiposo)	Cirugía reconstructiva de pechos	2008	~10 - 12	NA
Genzyme	Carticel	Producto a partir de células autólogas	Cartílago	Reparación de rodillas	1995	~83	~30%
Integra Life Science	Varios	Matriz acelular alogénica	Piel	Reparación y reemplazo de piel	2001	~20	25%
LifeCell	Alloderm	Matriz acelular alogénica	Piel	Reemplazo de piel y reparación de hernia	1994	167,1	40%
Medtronic	Infuse	Matriz con factores de crecimiento	Hueso	Fracturas de columna, orofacial y tibias expuestas	2002	~70	18%
Organogenesis	Apligraf	Células neonatales alogénicas con matriz	Piel	Úlceras de piel en diabéticos	1995	~30	> 10%
Osiris/ Nuvasive	Osteocel	Producto a partir de células alogénicas	Hueso	Reparación de fracturas	2005	15,2	83%
RTI	Spinal Implants	Matriz acelular alogénica	Hueso	Fracturas de columna	1991	11,1	17%
Stryker	OP-1	Matriz con factores de crecimiento	Hueso	Fusión de la columna y fracturas en hueso largos	2005	~80	60%

Tabla 1: Las 10 principales empresas del mundo relacionada con la medicina regenerativa (Adaptada de Lee Brucker, 2011).

La industria vinculada a los tratamientos con células prospera exponencialmente a pesar de los tiempos de crisis: solo la industria de terapia celular (sin incluir la medicina regenerativa) tuvo ventas globales de 410 millones de dólares en el 2008 y se prevé que aumente a 2.7 billones de

dólares para el 2012 y 5.1 billones de dólares para el 2014, si no más¹¹, lo que nos permite aventurarnos a predecir, que en un futuro muy próximo se avecinarán grandes cambios de la mano de la medicina regenerativa.

5. Tipos Celulares Empleados en Terapia Celular

La elección del tipo celular no sólo dependerá de su plasticidad a la hora de diferenciarse en los diferentes tipos celulares necesarios para el tejido u órgano a tratar, sino también de su disponibilidad y su capacidad de expansión *in vitro*, que determina el número total de células que se pueden obtener.

5.1 Autólogas o Alogénicas

Dependiendo del origen de dónde proceden las células, las células pueden ser autólogas o alogénicas (Figura 2). Las células autólogas son aquellas que proceden del propio paciente, es decir, son células que extraídas de un individuo se tratan y/o expanden *in vitro* y se vuelven a introducir en el mismo sujeto. Con este tipo de células se evita cualquier tipo de problema relacionado con el rechazo inmune o la contaminación por patógenos, por ello ha sido favorecidas médica e históricamente.

Las células alogénicas proceden de otra persona. se emplean en individuos en los que no se puede trabajar con sus propias células, bien porque no tienen suficientes, bien porque estas presentan algún tipo de anomalía que las hace inservibles. Las células extraídas, se expanden a gran escala y se almacenan en un banco celular en dosis terapéuticas. Para cada paciente, se seleccionan células de pacientes con la mejor compatibilidad inmunohistoquímica posible para evitar/reducir el rechazo inmune tras su implantación. Hay un tipo celular, las células progenitoras estromales de la médula ósea o tejido adiposo que por presentar un fenotipo pluripotente y muy poco inmunogénico^{13,14,15} son candidatos idóneos para terapia celular.

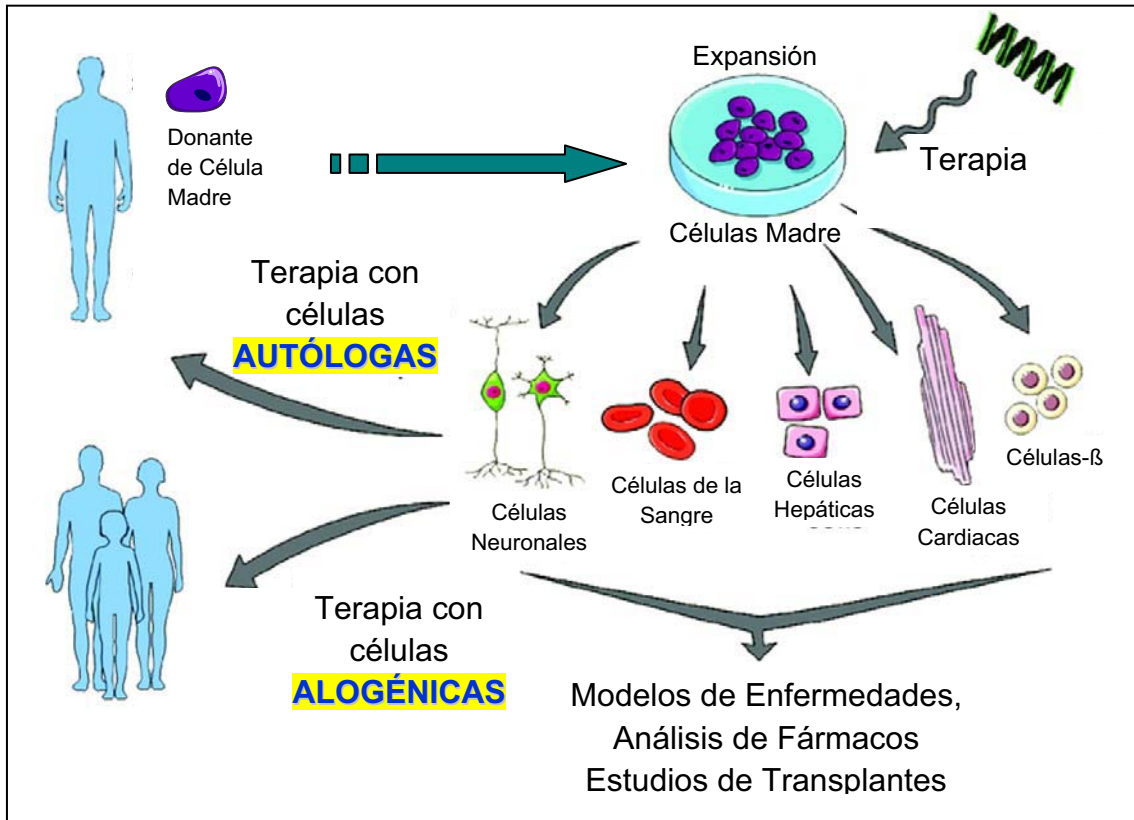


Figura 2: Estrategias de terapia celular con células autólogas o alogénicas (Adaptada de Power C., 2011).

5.2. Embrionarias, iPSCs o Adultas

La Figura 3 muestra un diagrama de los diferentes tipos celulares. Las células madre embrionarias (hESC) proceden de la masa interna del embrión en estadio de blastocisto (7-14 días). Estas células son pluripotentes, es decir, son capaces de diferenciarse a cualquier tipo de célula adulta del cuerpo humano¹⁶, además de tener la propiedad de auto-renovarse y proliferar indefinidamente. Aunque estas características hacen de ellas excelentes candidatas para tratamientos terapéuticos, aún no se ha demostrado su inocuidad; en ratones inmunodeprimidos son capaces de generar teratomas benignos¹⁷. Otro aspecto muy importante para su utilización es el relacionado con los aspectos éticos y legales. La utilización de embriones humanos en investigación es polémica en diferentes grupos sociales. Actualmente, la regulación para el uso de este tipo celular difiere mucho según el país. En España, en el 2004, se aprobó el Real Decreto 2132/2004 que permitía el uso para investigación de células madre

embrionarias humanas derivadas de pre embriones congelados sobrantes de fecundaciones *in vitro*.

En el 2007, se generó por primera vez células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), procedentes de células adulta humanas^{18,19}. Este nuevo tipo celular presenta una versatilidad equivalente a la de las células embrionarias, pueden dar lugar a cualquier tipo celular, pero su principal obstáculo es su tendencia a la formación de teratomas²⁰. Actualmente se buscan métodos alternativos para obtener iPSCs seguras, aunque a día de hoy, no contamos con un sistema efectivo y de alta eficiencia en la reprogramación celular. Aunque con respecto a las células embrionarias, las iPSCs presentan la ventaja de evitar los problemas éticos, existen ahora las primeras evidencias de que pueden ocasionar problemas relacionados con el rechazo a autotransplantes²¹, por lo que aún habría que seguir trabajando en esta línea para poder llevarlas a un procedimiento de terapia celular.

Las células madre adultas son células progenitoras que podemos encontrar en prácticamente cualquier tejido u órgano del cuerpo²². Estas células son multipotentes, es decir, su capacidad de diferenciación está más limitada que la de las embrionarias o iPSCs, pero son capaces de generar varios tipos celulares. Su función se cree que es la de reponer las células que se van muriendo y reparar los tejidos dañados, manteniendo de esta forma la homeostasis del organismo. Presentan, de forma natural, un gran potencial como agente terapéutico y regenerativo. El uso de estas células está ampliamente aceptado, por la comunidad “no científica”, ya que no implica la destrucción de ningún embrión humano y pueden obtenerse de prácticamente cualquier tejido adulto.

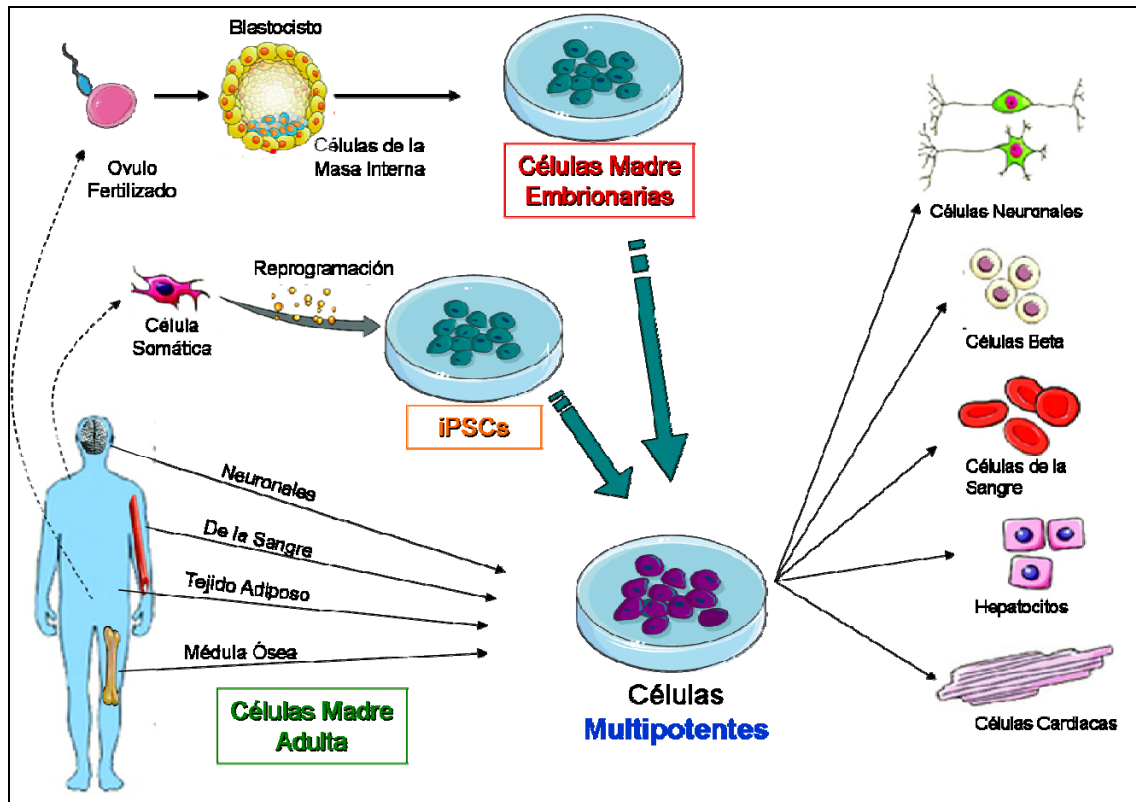


Figura 3: Tipos celulares empleados en terapia celular (Adaptada de Power C., 2011).

II. CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES

1. Definición y fuentes

Las células estromales mesenquimales o células madre estromales (MSC) son células madre adultas multipotentes. Tienen morfología fibroblastoide y capacidad de diferenciarse a diversos tipos de células^{23, 24}. La función exacta de estas células *in vivo* sigue siendo en gran parte una incógnita. En la médula ósea, se cree que son las células precursoras del tejido estromal necesario para la hematopoyesis²⁵. En otros tejidos, pueden responder a estímulos generados por el daño tisular o la inflamación, diferenciarse a células especializadas desempeñando un papel crucial en la reparación del tejido o controlar la inflamación.

Las MSC (Figura 4) pueden aislarse de prácticamente cualquier tejido²⁶: médula ósea²⁷, tejido adiposo²⁸, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio^{29, 30}, membrana sinovial³¹, músculo esquelético³², dermis³³, pericitos^{34, 35}, hueso trabecular^{36, 37}, cordón umbilical humano, pulmón, pulpa dental, e incluso de sangre periférica^{38, 39, 40}. De entre todas estas fuentes, las más empleadas en terapia celular son: médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical⁴¹.

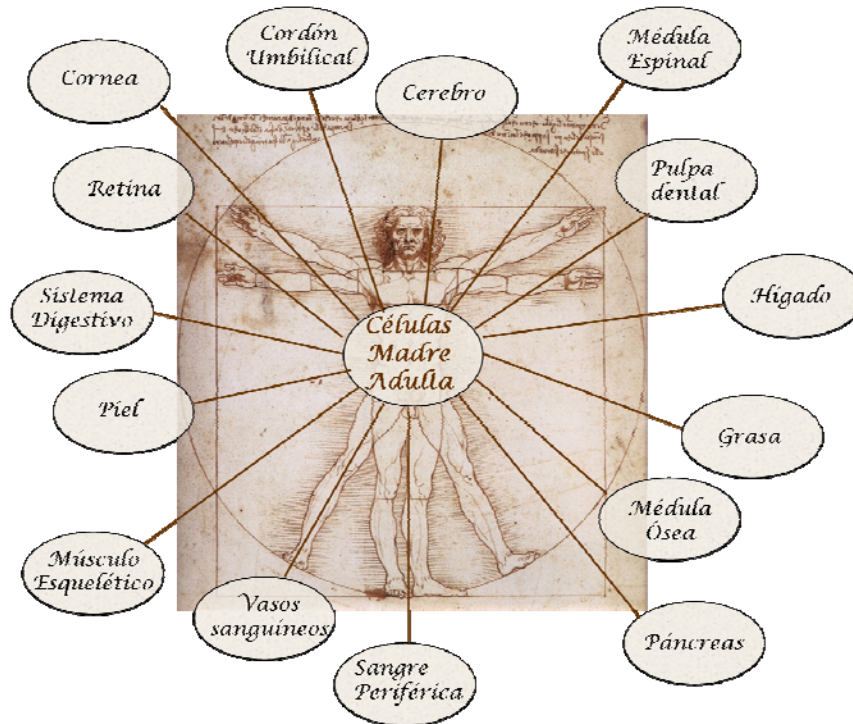


Figura 4: Orígenes de las células mesenquimales adultas.

El análisis comparativo de las propiedades de las MSC obtenidas de médula ósea y de tejido adiposo, ha demostrado que entre ellas, no existen diferencias morfológicas, inmunofenotípicas, en el patrón de los marcadores de superficie o capacidad de diferenciación y sólo presenta menos del 1% de diferencias en el perfil de expresión génica^{42, 43, 44, 45}. El uso de MSC procedente de tejido adiposo ha ganado adeptos, porque además de mantener las mismas propiedades que las células de la médula ósea, el procedimiento de obtención es menos invasivo, y las cantidades obtenidas son más elevadas; de un gramo de grasa se obtienen 400 veces más MSC que de un gramo de médula ósea⁴⁶.

Las MSC son positivas para determinados marcadores de superficie, ninguno de ellos específico para MSC⁴⁷. Durante años las MSC no dispusieron de una definición concreta. El hecho de que cada grupo empleara una metodología de extracción y fuentes diferentes, planteaba la duda de si las diferentes preparaciones representaban las mismas células. Para solucionar este problema, "The Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committee of the International Society for Cellular Therapy" (ISCT) redactó un informe consenso escrito por 10 expertos líderes en el campo de la investigación con MSC, en el

cual se propuso un conjunto de criterios estándar para poder definir la identidad de las MSC⁴⁸ (Figura 5):

- Las MSC deben adherirse y crecer en plástico en condiciones normales de cultivo.
- Más del 95% de la población de MSC debe expresar los antígenos específicos de superficie CD105, CD73 y CD90, adicionalmente, estas células no deben expresar (menos del 2% positivas) CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II.
- Las células deben ser capaces de diferenciarse *in vitro*, bajo los estímulos adecuado a diferentes linajes mesodérmicos, como puede ser: osteoblastos, adipocitos y condrioblastos.

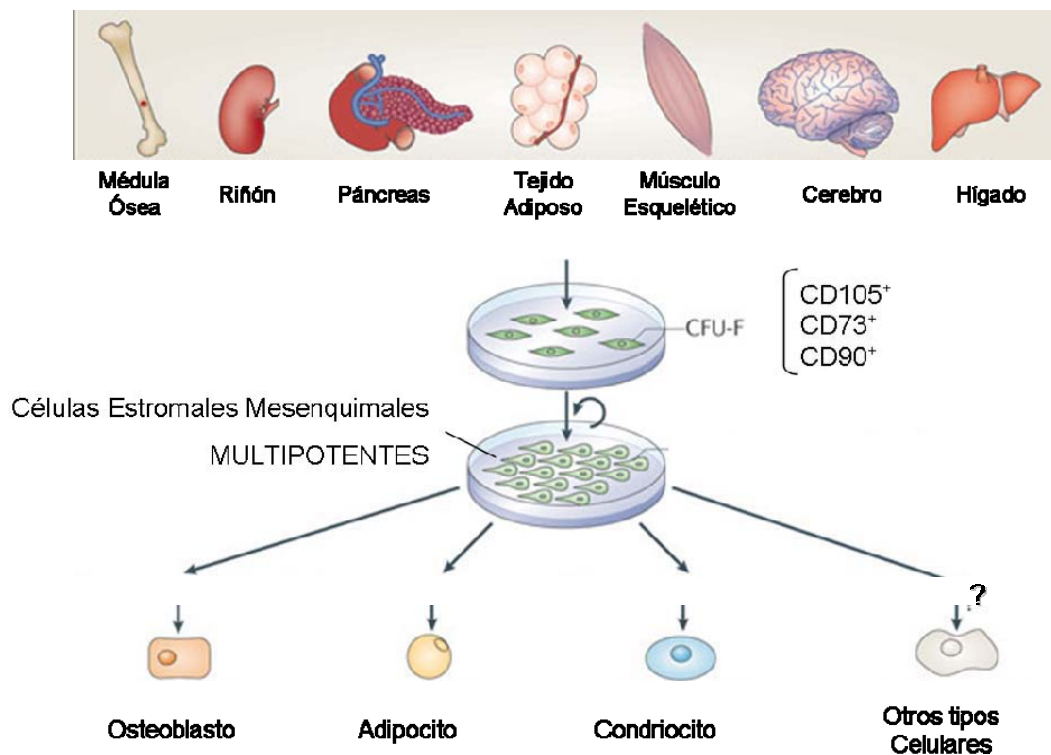


Figura 5: Características de las MSC.

2. Características

Las MSC presentan gran variedad de características. En los siguientes puntos resaltaremos aquellas de relevancia para la terapia celular.

2.1 Capacidad de expansión *in vitro*

Los tratamientos con células, generalmente requieren un gran número de células (del orden de 10^9 o más), con lo cual suele ser necesaria la expansión de las células que van a ser empleada como agente terapéutico.

Las MSC son capaces de adherirse al plástico y crecer por un número limitado de duplicaciones en condiciones de cultivo *in vitro*. El tiempo de duplicación celular va a depender de diferentes factores, por ejemplo, la densidad a la cual están sembradas las células va a influir tanto en la velocidad de proliferación como en el número de duplicación poblacional máximo alcanzado⁴⁹.

El tiempo de duplicación, al igual que otras propiedades, va cambiando con la edad del cultivo, según se avanza en el tiempo las células cultivadas *in vitro* menguan ciertas habilidades, la velocidad de proliferación va disminuyendo progresivamente hasta llegar al estado senescente. La senescencia es una propiedad característica de la mayoría de las células normales, progresivamente se pasa de un estado activo replicativamente hablando, a senescencia. Entre los muchos cambios que se asocian a esta fase uno característico es la expresión de la β -Galactosidasa dependiente del pH, detectable en células senescentes pero no en células quiescentes, inmortales o tumorales.

La proliferación celular pueden ser estimuladas o inhibidas, por diversas sustancias o factores de crecimiento. El medio estándar para crecer las MSC es el DMEM, con 10% de suero. En estas condiciones el tiempo de duplicación celular suele variar generalmente entre 2 y 6 días⁴⁵, dependiendo de los factores previamente mencionados. La necesidad de expandir las células en cultivo para obtener el número adecuado para el tratamiento, requiere tiempos de cultivo en algunos casos crítico para ciertas aplicaciones, a parte del

correspondiente riesgo de daño genómico. Muchos grupos intentan mejorar la “productividad” de estas células, mediante la adición de diversos agentes o factores de crecimiento o, por combinación de diferentes medios de cultivo^{50, 51, 52, 53}.

Las MSC tienen un inmenso potencial en la medicina regenerativa y la terapia celular, sin embargo, su tiempo de duplicación, relativamente largo, podría resultar un obstáculo en la obtención del número óptimo de células requerido en numerosos tratamientos.

2.2 Multipotencialidad

Una de las características que definen a las MSC es su capacidad para diferenciarse a diversos linajes, o lo que es lo mismo, su multipotencialidad. Desde que en 1924 Alexander A. Maximow las identificara como células capaces de diferenciarse a distintos tipos de células sanguíneas, el interés por este tipo celular ha ido incrementando.

Las MSC pueden diferenciarse a linajes mesodérmicos como: hueso, cartílago, adipositos, tejido conectivo del estroma, miocitos y cardiomiocitos^{54,55}. Diferentes trabajos sugieren que estas células poseen además, potencial para diferenciarse a otros linajes de origen no mesodérmicos; como por ejemplo a neuronas o epitelio de origen ectodérmico, o incluso a células pancreáticas o hepatocito, del linajes endodérmicos^{56, 57, 58} (Figura 6).

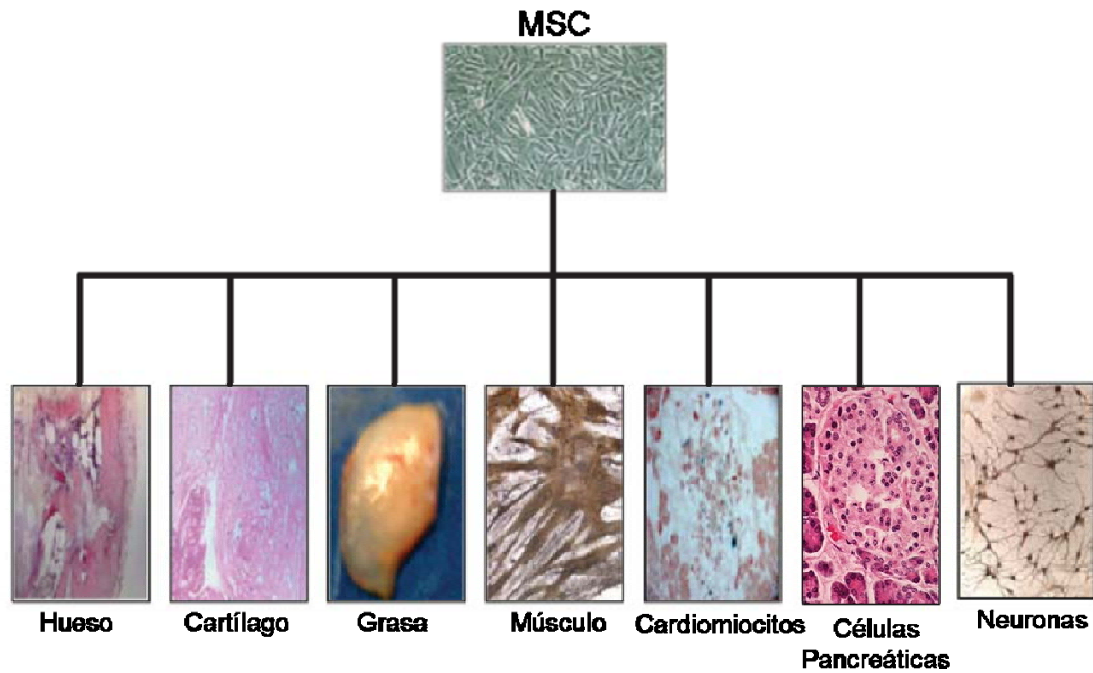


Figura 6: Potencial de diferenciación de las MSC.

En la Tabla 2 se recogen algunos de los medios utilizados para inducir los diferentes linajes, y la evaluación de dicha diferenciación. Los factores de crecimiento capaces de regular las MSC incluyen: la superfamilia TGF- β (Transforming growth factor-beta), IGF (insulina-like growth factor)⁵⁹ PDGF (platelet-derived growth factor), VEGF (vascular endotelial growth factor)⁶⁰ y los factores de la familia Wnt. Como ejemplo, la familia del TGF- β así como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), son unos de los más potentes inductores de la condriogénesis.

Además de los factores de crecimiento, algunos productos químicos también pueden promover la diferenciación a determinados linajes. Por ejemplo, incubar MSC con dexametasona, insulina, isobutilo metil xantina e indometacina, determina a estas células a diferenciarse a adipocitos. El tratamiento con 5-azacitidina y anfotericina-B, da lugar a mioblastos que pueden fusionarse en un miotubo y latir rítmicamente⁶¹. El suplemento con nicotinamida y β -mercaptoetanol induce a la formación de las células B de los islotes pancreáticos⁶².

Diferenciación	Medio de Inducción	Tinciones IHQ
Adipogénico	Insulina, IBMX, dexasometasona, rosiglitazona, indometacina	Oil Red O
Condriogénico	BMP-6, BMP-7, FGF-2, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, dexametasona, IGF-1	Toluidine Blue
Osteogénico	1,25(OH) $_2$ D $_3$, β -glicerofosfato, ácido ascorbico, BMP-2, dexasometasona, ácido valproico	Von Kossa
Miogénico (musculo esquelético)	DMS, ácido linoleico, ácido ascorbico, MCDB-201, EGF, PDGF-BB, 5-azacitidina	Factor de transcripción miogenina MYO-D
Miogénico (musculo liso)	D-eritro-SPC, TGF- β 3	α -actina de músculo liso, fosfo-Smad2, fosfo-ERK
Miogénico (cardiomocitos)	5-azacitidina, IMDM	Cadena pesada y ligera de miosina de la α -actina
Neurogénico	Ácido valproico, insulina, hidroxianisol, hidrocortisona, EGF, FGF	Tinción para agentes específico (p.e.: NF-L, β 3-Tubulina, PMP-22, GFAP, NeuN)
Pancreático (endocrino)	Activina-A, exendina-4, pentagastrina, HGF, nicotinamida, alta concentración de glucosa	Tinción para agentes específico (p.e.: diftione, insulina, PDX-1, glucagon, Pax4)
Hepático	HGF, OSM, DMSO	Ácido periódico-Schiff (PAS), Tinción específica (p.e.: AFP, albumina)

Tabla 2: Inducción y evaluación de la diferenciación *in vitro* de las MSC (Adaptada de Mosna F. 2010 y Schäffler A. 2007).

La mayoría de los resultados de diferenciación se obtuvieron de experimentación *in vitro*, pero ponen en evidencia la capacidad de estas células para diferenciarse *in vivo*. La diferenciación *in vivo* de las MSC implantadas debe ser más compleja, ya que también participan señales propias del microambiente local. Basándonos en el conocimiento actual, parece ser que, las MSC según las señales del tejido local puede dar lugar a 3 tipos de células diferentes: (1) células de tejido específico, necesarias para tejidos dañados. Por ejemplo, las MSC podrían dar lugar a cardiomiocitos o células endoteliales, componentes importantes del tejido cardíaco^{63, 64, 65}. (2) Células con una función determinada requeridas por el tejido local, que posiblemente participen en la composición del nicho celular, necesario para la propia reparación del tejido⁶⁶. (3) Células reguladoras, contribuyen en la regeneración y reparación del tejido mediante la secreción de determinadas citoquinas y/o inmunomodulación⁶⁷.

Los mecanismos moleculares y ambientales que controlan la diferenciación de las MSC se desconocen en gran parte, aún no se ha identificado un fenotipo de

marcadores determinado que se asocie con un potencial de diferenciación predecible¹⁰⁰.

2.3 Capacidad de Migración

De forma inherente, las MSC tienen la propiedad de migrar e implantarse en tejidos que han sufrido algún tipo de lesión y liberan citoquinas, moléculas implicadas en el desarrollo de la inflamación. Las MSC expresan varios receptores de citoquinas que las movilizan y hacia las zonas dañadas⁶⁸ Chapel y su equipo⁶⁹ demostró en un modelo de disfunción orgánica múltiple que las MSC marcadas con GFP se alojaban en los diferentes tejidos dañados, en correlación con la gravedad y la geometría de la lesión.

Las células estromales de la médula ósea y otros progenitores, como por ejemplo las células progenitoras endoteliales, expresan constitutivamente: SDF-1/CXCL12, un miembro de la familia de las citoquinas⁷⁰. Hay estudios que demuestran que MSC de pases tempranos^{71, 72} expresan receptores específicos para SDF-1(CXCR4), además de diferentes moléculas de adhesión^{73, 74, 75} que responden tanto a SDF-1 como a otras quimioquinas: CX3CL1, CXCL16, CCL3, CCL19, y CCL21^{76, 77}. Se ha descrito, que la producción de óxido nítrico derivada de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial promueve la migración de las MSC hacia las zonas isquémicas del miocardio, mediante estimulación positiva del ligando SDF-1⁷⁸; de hecho, la sobre-expresión de SDF-1 en tejido cardiaco, demostró una mejora en la migración e incorporación de estas células en el tejido isquémico⁷⁹. Además del sistema SDF-1/CXCR4, se han estudiado otros mecanismos relacionados con la movilización de las MSC, como por ejemplo: la vía CCL21/CCR7^{80, 81} o las integrinas⁸² (Figura 7).

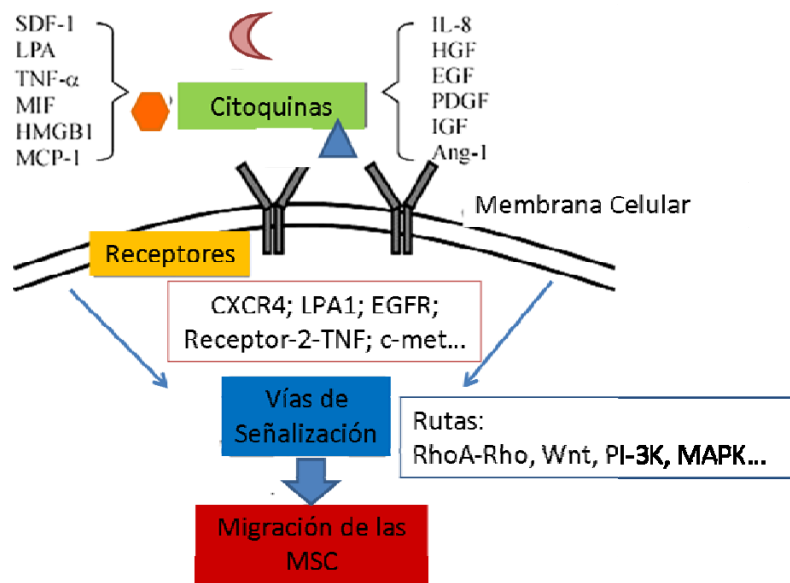


Figura 7: Factores que regulan la migración en las MSC (Adaptada de Li Li, 2011).

El hecho de que las células mesenquimales expresen varios tipos de receptores de citoquinas, sugiere que subpoblaciones concretas de células puedan presentar cierto potencial para ir a determinados tejidos dianas, en los cuales, contribuiría con su reparación y/o atenuación de la inflamación⁸³.

La capacidad de migración como muchas otras propiedades de las MSC, no es una característica estable que persista en las células indefinidamente. La capacidad de migración va menguando según aumenta el tiempo en cultivo⁸⁴, lo que se debe a una disminución en la expresión de moléculas de adhesión, pérdida de receptores de citoquinas, y por lo tanto falta de la respuesta quimiotáctica^{85, 86}.

2.4 Estabilidad Genómica

El uso de células madre para terapia celular está totalmente vinculado a la evaluación de su seguridad y el riesgo que puedan ocasionar en un tratamiento determinado. El potencial oncológico puede ser determinado por diferentes pruebas, p. ej, el análisis de la estabilidad genómica y los xenotrasplantes en animales inmunosuprimidos.

La estabilidad genómica de las MSC es un tema de gran controversia entre los diferentes grupos de investigación. Actualmente se sigue debatiendo si las

MSC son genómicamente estables o no. Estudios recientes demuestran que las MSC poseen una robusta estabilidad cromosómica⁸⁷, mientras que otros, manifiestan que periodos prolongados de cultivo de estas células hacen que de forma espontánea se generen aberraciones cromosómicas^{88, 89, 90}. Algunos trabajos, asocian dichos cambios a la adquisición de una ventaja de crecimiento *in vitro*, otros, sin embargo, han demostrado que estos cambios no confieren ningún tipo de ventaja de selección *in vitro*, además, documentan que dichas aneuploidías van desapareciendo con el tiempo, y la célula llega a su fase senescente sin sufrir ningún proceso de transformación tanto *in vitro* como en xenotrasplantes⁹⁰. Otras publicaciones sostienen que ciertos cambios, como por ejemplo la monosomía del cromosoma 13, conceden la característica de inmortalidad a la célula⁹¹, aberración que coincide con la monosomía más común en tumores de hueso y tejidos blandos⁹². Pero también podemos encontrar en la literatura casos donde el proceso de transformación se ha debido a contaminación cruzada con células tumorales y/o otros artefactos^{93, 94, 95, 96}.

Las anomalías cariotípicas no deben relacionarse directamente con el riesgo de transformación. Las aneuploidías pueden relacionarse tanto con la transformación como con el efecto contrario, protección contra la transformación, dependiendo de los genes que se vean afectados por esta ganancia o pérdida de copias.

Este debate queda abierto hasta que pruebas más concluyentes determinen si las MSC presentan o no estabilidad genómica y cuál sería su repercusión en las células, y por consiguiente en la terapia celular. Mientras tanto, y debido a la controversia que este asunto despierta, sería recomendable realizar este tipo de ensayos en las células que posteriormente se van a emplear para el tratamiento, para poder determinar así su nivel de seguridad.

2.5 Efectos Paracrinos

La comunicación paracrina es un tipo de señalización intercelular basado en mensajeros químicos, quimioquinas y factores de crecimiento entre otros, que se intercambian entre células que están relativamente cercanas.

Cada vez existen más evidencias de que las señales paracrinas de las MSC desempeñan un papel crítico en la reparación de las heridas. Los medios condicionados, son aquellos en los cuales han sido crecidas las células, y por tanto, contienen diferentes moléculas liberadas por estas. Se ha demostrado que los medios condicionados de las MSC, tanto de médula ósea⁹⁷ como de tejido adiposo⁹⁸, tienen un efecto reparador similar al de la implantación de las propias células. Esto abre una nueva corriente de pensamiento para los distintos tratamientos, donde la célula no tiene porqué diferenciarse y reemplazar las células dañadas para reparar los tejidos sino que, desempeñarían un papel activando los propios mecanismos de regeneración en las células vecinas. Incluso, en algunos casos no haría falta la implantación de la célula en sí⁹⁹.

Las MSC secretan una amplia gama de moléculas con diversos efectos paracrinicos: inmunomoduladores, anti-cicatrizantes, quimioatrayentes, estimulantes de la mitosis, proliferación y diferenciación de células madre precursoras intrínsecas de órganos y angiogénicos. El número de moléculas secretadas por las MSC con efecto paracrino aumenta diariamente. En la Figura 8 se representan los factores que han demostrado ser secretados por la MSC en cultivo y su posible acción conocidos hasta la fecha.

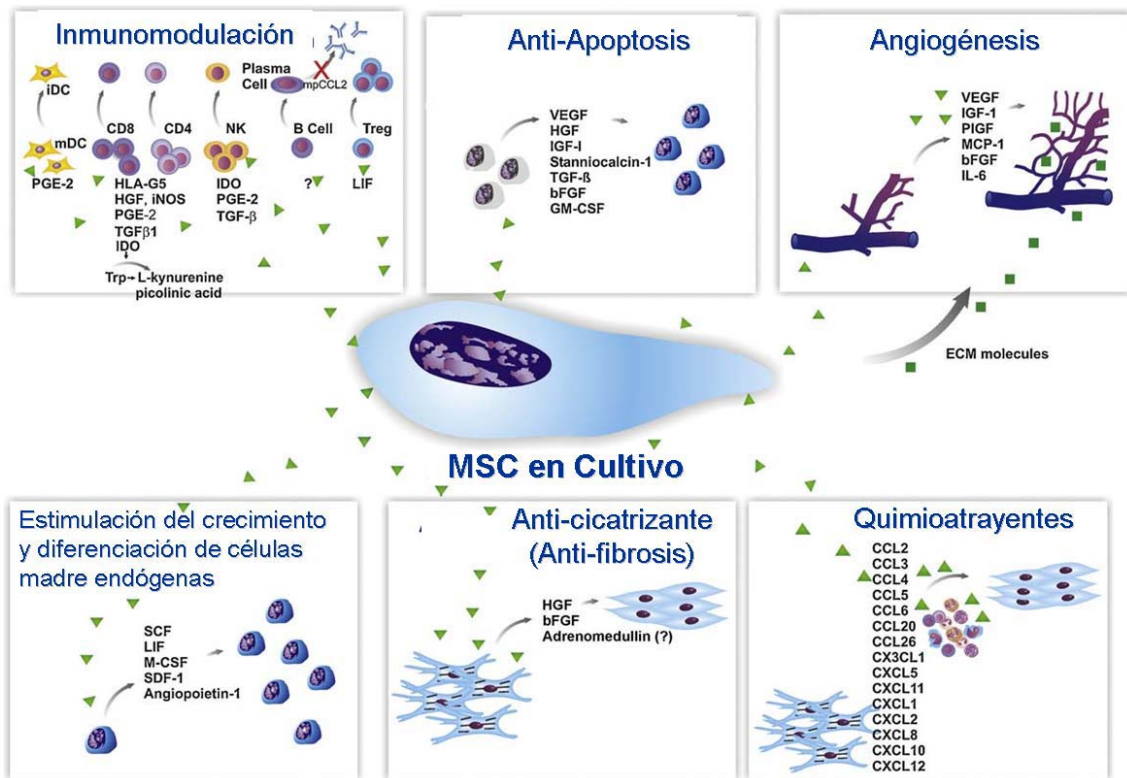


Figura 8: Factores secretados por las MSC en cultivo y su posible función (Adaptada de L. da Siva, 2009).

3. Usos Terapéuticos de las MSC de tejido adiposo (AMSC)

Las MSC son una prometedora fuente de agentes terapéuticos para un dilatado rango de enfermedades. Las razones, anteriormente detalladas, son muchas e incluyen: fácil aislamiento y expansión en cultivo, multipotencialidad, efectos paracrinos, propiedades inmunomoduladoras, conducta migratoria y consideraciones éticas^{100,101,102,103}. Todas estas características justifican el crecimiento exponencial del número de investigadores o ensayos clínicos que emplean MSC. Las AMSC en particular, además de tener propiedades muy similares a las de la médula ósea, se obtienen en mayor cantidad y por un procedimiento mucho menos invasivo.

Día a día, las AMSC amplían su campo de actuación en ensayos clínicos. Hasta la fecha, estas células se empleaban principalmente en tratamientos de tejidos blandos, pero actualmente se van incorporando en aplicaciones cada vez más diversas. ClinicalTrials.gov¹⁰⁴, una base de datos que recoge los ensayos clínicos realizados en todo el mundo, contiene actualmente 124.137

ensayos localizados en 179 países (Abril, 2012), patrocinados por Institutos Nacionales de Salud, otras agencias federales y la industria privada. Si a día de hoy, buscamos los ensayos basados en AMSC, encontramos que se están llevando a cabo más de 50 estudios, de los cuales aproximadamente el 30% de ellos, se están realizando en España.

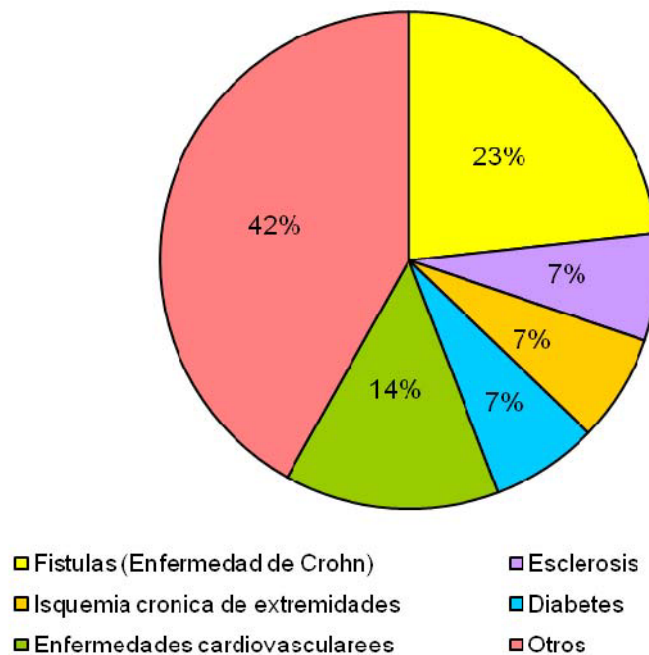


Figura 9: Distribución actual de los ensayos clínicos para el tratamiento de las principales enfermedades tratadas con AMSC (ClinicalTrials.gov, Abril, 2012).

Si agrupásemos estos trabajos por el tipo de enfermedad que se trata (Figura 9), podemos constatar que a nivel mundial: el 23% de estos trabajos se realizan para tratar fístulas crónicas en la enfermedad de Crohn, mediante inyección de AMSC en la mucosa del recto. La fístula tratada con AMSC cicatriza o se cura completamente, significativamente mejor cuando se trata con células.

Las enfermedades cardiovasculares constituyen el 14% de ensayos tratados con AMSC. En diferentes ensayos, se han detectado mejorías del 3% al 4% (rango de 2% a 7%); los datos sugieren una mejora de la función ventricular y la fracción de eyección cardiaca (contractilidad), pero no en el remodelado del ventrículo. Por ello, es necesario seguir trabajando en este campo y optimizar

INTRODUCCIÓN

el tiempo de tratamiento, tipo celular, dosis, y método de administración. También se debe investigar la influencia de los efectos paracrinos por liberación de citoquinas, tanto a nivel de cicatrización como de estimulación de las propias células madre endógenas cardíacas.

En la cuña mayoritaria (42%), quedan recogidas una gran variedad de enfermedades con uno o dos ensayos en curso, entre las cuales podemos encontrar: autismo, osteoporosis, parkinson, artritis, o reconstrucción de cartílago de rodilla.

III. TERAPIAS PARA ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares son uno de los principales problemas de salud del mundo occidental industrializado. El infarto agudo de miocardio (IAM) se encuentra entre una de las enfermedades más graves, y se produce cuando se interrumpe el suministro de sangre al corazón, dando lugar a la isquemia miocárdica y necrosis y posteriormente, a la formación de una gran cicatriz no contráctil en una parte del músculo cardíaco¹⁰⁵.

Según la Organización Mundial de la Salud, se producen 7,1 millones de muertes al año por enfermedad coronaria en todo el mundo¹⁰⁶. En España en concreto, más de 74.000 pacientes son hospitalizados cada año debido a un IAM o una angina¹⁰⁷, constituyendo la primera causa de mortalidad en hombres y la segunda en mujeres, lo cual representa un 32.8% del total de defunciones. Después de superar un infarto, la complicación más frecuente es la insuficiencia cardíaca debida a los cambios tisulares, geométricos y funcionales que se han producido en el corazón, conocidos como remodelado ventricular. Estos cambios, prácticamente irreversibles, provocan que el corazón pierda eficacia para bombear la sangre hacia los tejidos.

A pesar de que en los últimos años se ha conseguido una reducción considerable de la mortalidad aguda post-infarto, la insuficiencia cardíaca causada por la remodelación ventricular es cada vez más frecuente; lo cual refleja la necesidad de nuevos tratamientos que permitan sustituir las células muertas por células funcionales, objetivo que no cubren los tratamientos actuales. Hoy en día, a los pacientes que han superado la fase aguda del infarto se les aplica tratamientos a largo plazo con diferentes fármacos. Estos tratamientos son paliativos, ninguno de ellos sustituye el tejido miocárdico muerto en el infarto¹⁰⁸, y aunque su eficacia para mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los enfermos ha sido demostrada, más de la mitad de los

pacientes mueren durante los 5 años posteriores al diagnóstico inicial de la enfermedad¹⁰⁹.

Actualmente, solo un pequeño número de pacientes puede tener la oportunidad de recibir el único tratamiento que consigue recuperar completamente la función del corazón, que es el trasplante de corazón. La terapia celular podría convertirse en una alternativa si se demuestra su eficacia en la remodelación ventricular, reconstruyendo el tejido afectado y su función, y así recuperar el soporte estructural necesario para la contracción adecuada del corazón.

El corazón presenta relativa capacidad de regeneración después de determinados procesos patológicos como puede ser un infarto de miocardio^{110,111} o insuficiencia cardíaca¹¹². Aunque las células madre cardíacas^{113,114} son esenciales para el proceso natural de regeneración y homeostasis cardíaca, son insuficiente para regenerar el corazón después de un daño severo como es un IAM.

El objetivo de la terapia celular del miocardio se centra en la cardiomioplastia celular, que consiste en la reparación del tejido dañado mediante la implantación de células progenitoras angiogénicas o cardiomiogénicas en la zona del ventrículo infartado. Idealmente, estas células deberían contribuir en la generación de nuevo tejido miocárdico y en la formación de vasos^{115, 116, 117}. Para este tipo de estrategia el tipo celular óptimo debe ser capaz de¹¹⁸:

1. Ser expansible a gran escala en cultivo *in vitro*.
2. Sobrevivir en la zona del tejido dañado
3. Diferenciarse a nuevas células de músculo cardíaco con capacidad de acoplarse electromecánicamente a las células vecinas.

Desde hace un par de décadas, se han venido investigando diferentes tipos de células madre para estas nuevas corrientes de tratamiento, buscando aquellas con mejor resultado en la reparación del miocardio dañado^{115, 119, 120, 121}. A

continuación, se describe brevemente algunos de los tipos celulares empleados.

1. Tipo de Células empleadas

Existe un amplio rango de tipos celulares empleado en las terapias regenerativas del corazón, que va desde los mioblastos esqueléticos^{122, 123}, que fueron el primer tipo celular utilizado, hasta las iPSCs uno de los más recientes tipos celulares. Este abanico recoge células como: progenitores endoteliales, células mesenquimales de médula ósea o tejido adiposo, células madre cardíacas y células madre embrionarias (Figura 10) con características y propiedades que les confieren ventajas y desventajas, para su uso en la regeneración cardíaca. Proseguiremos detallando algunas de sus características.

Las primeras células empleadas para regeneración celular cardíaca, en concreto, fueron los mioblastos o células satélites, que son células madre adulta de músculo esquelético¹²⁴. Estas células eran interesantes por ser autólogas, poder amplificarse *in vitro* y presentar buena supervivencia después de su implantación, gracias a su alta resistencia a las condiciones isquémicas¹²⁵. Pero eran incapaces de acoplarse eléctricamente y sincronizarse con el resto del tejido cardíaco^{126, 127}; en algunos estudios en modelos animales presentaron efectos beneficiosos, mejorando la función contráctil ventricular^{128, 129}, sin embargo en ensayos de fase I, más de la mitad de los pacientes tratados con ellas necesitaron de desfibriladores por presentar arritmias ventriculares malignas^{125, 130}. Otro tipo celular empleado fue las células progenitoras endoteliales de sangre periférica, que tienen la propiedad de movilizarse en diversos procesos patológicos como el IAM o la insuficiencia cardiovascular, y además están presentes en zonas de neovascularización^{131,132}. Diversos ensayos y estudios clínicos demuestran la capacidad de revascularización de la cicatriz y mejorar la función ventricular^{133,134,135}, incluso después de un periodo de seguimiento de 2 años^{136,137}. A pesar de los prometedores resultados, la frecuencia de estas células es bajísima (y aún más en pacientes con factores de riesgo cardiovascular), además, presentan baja eficiencia de incorporación al corazón

(máximo un 10%¹³⁷, baja capacidad de expansión *ex vivo*, y sus propiedades funcionales se deterioran con la edad o la diabetes; constituyendo importantes limitaciones para el trasplante autólogo.

Las células madre embrionarias son las que presentan mayor capacidad de diferenciación a cardiomiocitos funcionales^{138,139}. Presentan marcadores cardiacos característicos y pueden acoplarse al impulso de excitación-contracción^{133,136,140}. Los primeros estudios *in vivo* con estas células fueron alentadores^{141,142,143}, ya que demostraban la correcta diferenciación, integración física y electromecánica del injerto y con ello una disminución del remodelado post-infarto y mejora de la revascularización de la zona infartada, mejorándose la función cardiaca. Estudios posteriores, a diferencia de los primeros, observaron que estas células formaban teratomas en el corazón^{144,145}, lo cual supuso un freno en el avance en esta línea de investigación. Para llegar a la aplicación clínica con estas células, se deben desarrollar protocolos que permitan obtener preparaciones de cardiomiocitos funcionales a gran escala y de gran pureza, que no generen teratomas y superen el inconveniente del rechazo inmunitario del injerto.

Las MSC pueden diferenciarse a linaje miogénico, según se ha demostrado en modelos animales, y además, mejoran la función cardiaca y la revascularización de la zona infartada, ya sea mediante diferenciación a células endoteliales¹⁴⁶ como por su propiedad de secretar diversas citoquinas promotoras de la neoangiogénesis. Los primeros ensayos clínicos con estas células demostraron que tras su inyección por vía intracoronaria mejoraron la función cardiaca¹⁴⁷ y la fracción de eyección¹⁴⁸. Más recientemente, se han ido probando MSC derivadas de grasa (AMSC), dado sus ventajas ya mencionadas anteriormente para terapia celular. Y se ha comprobado que en diferentes modelos de animales, las AMSC mejoran la estructura y función cardiaca, y aumenta la angiogénesis local ya sea por propia diferenciación a célula endotelial o por la generación de señales paracrinas, que confiere protección cardiovascular^{149, 150, 151}.

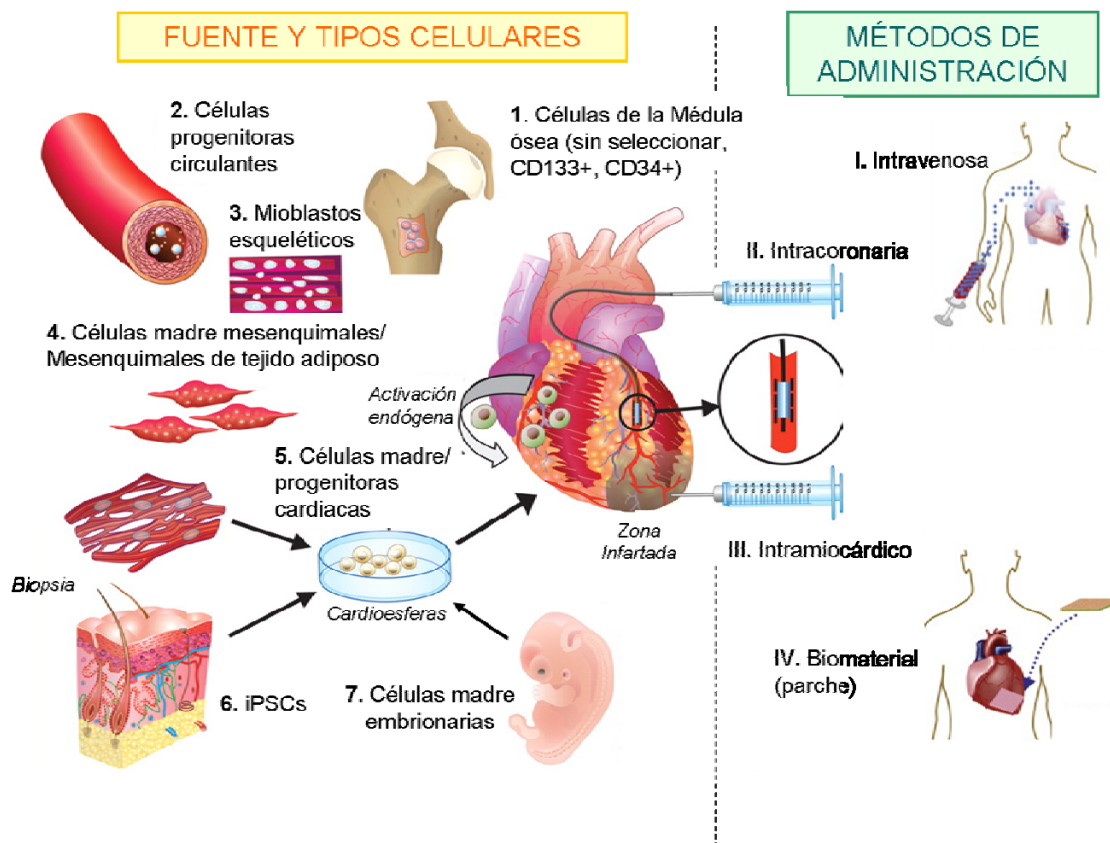


Figura 10: Tipos celulares (izquierda) y los métodos de administración (derecha) empleados en la terapia celular de la isquemia cardíaca.

2. Método de administración de las células

Algunos tipos celulares como los monocitos de médula ósea, mioblastocitos y MSC se han aplicado en suspensión al el corazón infartado, a diferentes tiempos y por diversas rutas (intravenosa, intracoronaria, inyección directa en el miocardio desde el epicardio en operaciones a corazón abierto, o inyección endomiocárdica empleando catéteres) (Figura 10). Estos procedimientos produjeron escasas mejoras en las funciones cardíacas y la supervivencia de las células implantadas fue limitada. No hay interacción con los cardiomiocitos pre-existentes ni acoplamiento electromecánico a través de las uniones celulares, por lo cual, las células implantadas no soportan las fuerzas mecánicas y las condiciones de hipoxias a las que se ve sometida^{152,116,153,154}.

En vista de la escasa tasa de supervivencia y las dificultades que presentaba la implantación celular, en los últimos años se han generado nuevas estrategias que incluyen la ingeniería de tejidos entre otros. La ingeniería tisular combina células, biomateriales y factores de crecimiento, para generar una estructura 3D compatible con el tejido a tratar. Ejemplos de ellos son: (1) implantación de láminas celulares libres de andamiaje (*scaffold-free cell sheets*)¹⁵⁵, (2) inyección directa de la mezcla células y biomaterial en el tejido dañados^{156,157} (3) implantación de un biomaterial como un soporte (de estructura porosa) o parche (estructura densa) que contiene las células terapéuticas^{158,159,160}. Los biomateriales nos han permitido mejorar la tasa de supervivencia celular. Las células atrapadas en una estructura, pueden ser condicionadas con diferentes factores de crecimiento que favorecen la supervivencia celular y/o que mejoran la capacidad miogénica o angiogénica. Además, en estas condiciones las células quedan más protegidas de las fuerzas mecánicas^{161,162}.

IV. MONITORIZACIÓN DE CÉLULAS *IN VIVO*

La terapia celular es una práctica muy prometedora, pero aún queda por profundizar en el conocimiento del comportamiento de las células inoculadas *in vivo*. Para ello, se requieren técnicas de análisis que nos permitan estudiar su comportamiento. Para poder interpretar las complejas interacciones que tienen lugar entre nuestras células y los diferentes tejidos y biomateriales, estos procedimientos deben idealmente permitirnos evaluar la terapia en tiempo real, óptimamente de forma no invasiva.

Algunas de las características ideales de estos procedimientos deberían ser¹⁶³ :

1. Biocompatibilidad (seguridad y no toxicidad).
2. Sensibilidad (capacidad de detectar el menor número posible de células).
3. Cuantificación (permite contabilizar el número de células).
4. Evitar la dilución del reporter con la proliferación celular
5. No ser invasivas para usarse en sujetos vivos.

En las últimas décadas ha habido un gran aumento del número de tecnologías de imagen, tanto para la clínica como para la investigación. Podemos agrupar los diferentes sistemas de imagen según la energía que utilizan para obtener la información visual (rayos X, rayos gamma, positrones, fotones y ondas acústicas), según la resolución espacial que consiguen (macroscópica, mesoscópica o microscópica) o bien según el tipo de información que se obtiene (anatómica, fisiológica, celular o molecular). Los sistemas de imágenes macroscópicas que dan información anatómica y fisiológica son actualmente muy utilizados en clínica y preclínica. Ejemplos de este tipo de imagen son la tomografía computerizada (CT), las imágenes de resonancia magnética¹⁶⁴ y los ultrasonidos. Por otro lado, están los sistemas

INTRODUCCIÓN

que dan información molecular, de los cuales sólo algunos se encuentran en uso clínico o preclínico, ejemplos de ellos sería la tomografía de emisión de positrones (PET), la fluorescencia de reflectancia, la microscopía de fibra óptica o la bioluminiscencia. En la siguiente figura (Figura 10) encontramos resumido los diferentes tipos de sistema de imágenes.

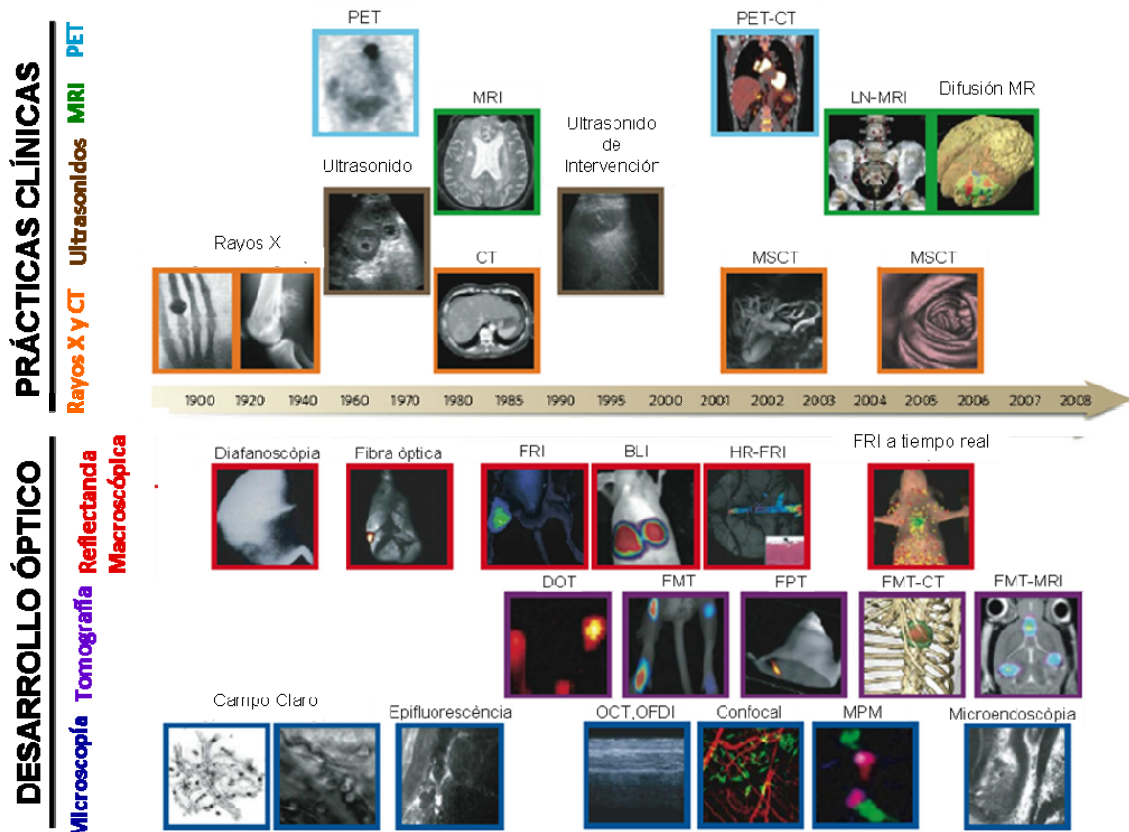


Figura 11: Progresión en el desarrollo de los procedimientos de imagen (Adaptada de Weissleder R., 2008).

Debido a que cada tecnología tiene sus ventajas y sus limitaciones (Tabla 3) se han desarrollado plataformas que combinan diferentes sistemas

Técnica	Resolución	Profundidad	Tiempo	Cuantitativo	Más de un canal	Uso en animales	Uso clínico
MRI	10-100 μm	sin límite	Minutos a horas	Sí	No	Análisis fisiológico, molecular y anatómico	Sí
CT	50 μm	sin límite	Minutos	Sí	No	Pulmón y hueso	Sí
Ultrasonidos	50 μm	cm	Segundos a minutos	Sí	No	Vascular e imágenes por intervención	Sí
PET	1-2 mm	sin límite	Minutos a horas	Sí	No	Modalidad de imagen versátil con muchos trazadores	Sí
SPECT	1-2 mm	sin límite	Minutos a horas	Sí	No	Anticuerpos, proteínas y péptidos marcados	Sí
Fluorescencia	2-3 mm	<1 cm	Segundos a minutos	No	Sí	Procesos en enfermedades basados en superficies	Sí
FMT	1 mm	<10 cm	Minutos a horas	Sí	Sí	Imagen cuantitativas	En desarrollo
BLI	Varios mm	cm	Minutos	Sí	Sí	Expresión génica y migración celular	No

Tabla 3: Características principales de las diferentes técnicas de imagen (Adaptada de Massoud T.F, 2003).

1 . Bioluminiscencia: Técnica Óptica de Imagen

Se conoce como bioluminiscencia a la producción de luz de ciertos organismos. La emisión de luz es el producto de una reacción química catalizada por un enzima (luciferasa) que oxida un sustrato (luciferina). Las luciferasas están ampliamente distribuidas en el reino animal, y pueden tener diferentes espectros de emisión y/o sustratos como se muestra en la Figura 12.

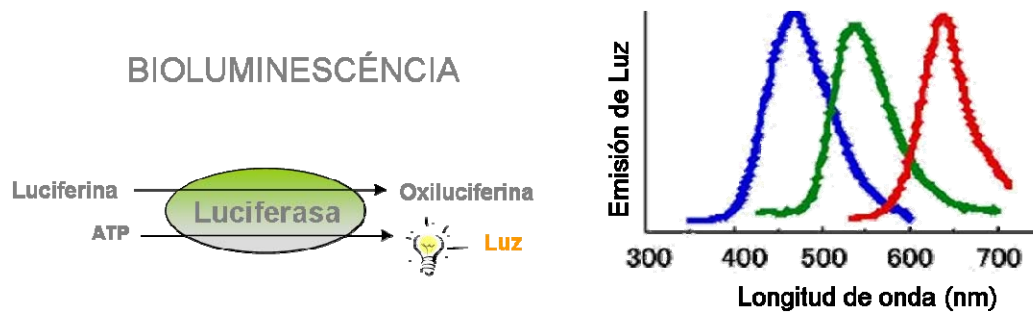


Figura 12: Izquierda, Prototipo de reacción de luciferasa (*Photinus pyralis*). Derecha, espectro de emisión de diferentes luciferinas. Verde, *Photinus pyralis*; azul, *Renilla reniformis* y rojo, *Pyrophorus plagiophalamus*

1.1 Tipos de Luciferasas

Las luciferasas más ampliamente utilizadas son:

- *Luciferasa de la luciérnaga*

Este tipo de luciferasa se encuentra en el insecto *Photinus o Luciola*. Es una de las luciferasas más utilizadas y estudiadas, fue purificada y caracterizada en 1978 (Figura 13). Su ADNc fue clonado y expresado en *E. coli* por Wet et al. en 1985. Esta luciferasa necesita ATP como cofactor, su sustrato es la luciferina y tiene un espectro de emisión que va de 550 a 570 nm (Figura 12). Presenta un pico de actividad que dura entre 15 y 25 minutos después de la inyección del sustrato y su emisión de luz puede ser detectada hasta 2 o 3 horas después. El hecho de que la relación entre la concentración del sustrato y la luz emitida sea lineal, junto con la existencia de detectores de fotones con una respuesta también lineal en un rango de 7 órdenes de magnitud, hacen que este trazador sea muy conveniente para la generación de imágenes *in vivo* (BLI)¹⁶⁵ ya que nos permite detectar luciferasa en el rango de femtomoles.

- *Luciferasa con sustrato colenterazina*

Una de las luciferasas más conocidas que utilizan colenterazina como sustrato es la de *Renilla reniformis* (RLuc), una anémona, su ADNc fue aislado por Lorenz et al. en 1991 (Figura 13). La proteína comparte homología con la calmodulina, su actividad está controlada por la concentración de Ca^{2+} . El punto de emisión máximo de su espectro se encuentra en los 480 nm (Figura 12) y su cinética es muy rápida; se inicia a los 10 segundos y baja rápidamente

durante los 10 minutos siguientes a la inyección del sustrato¹⁶⁶. La reacción de la RLuc es mucho más simple que la de la PLuc ya que no necesita cofactores. Su rápida cinética también le daría ventajas en experimentos donde se requiere que la señal se pierda rápidamente.

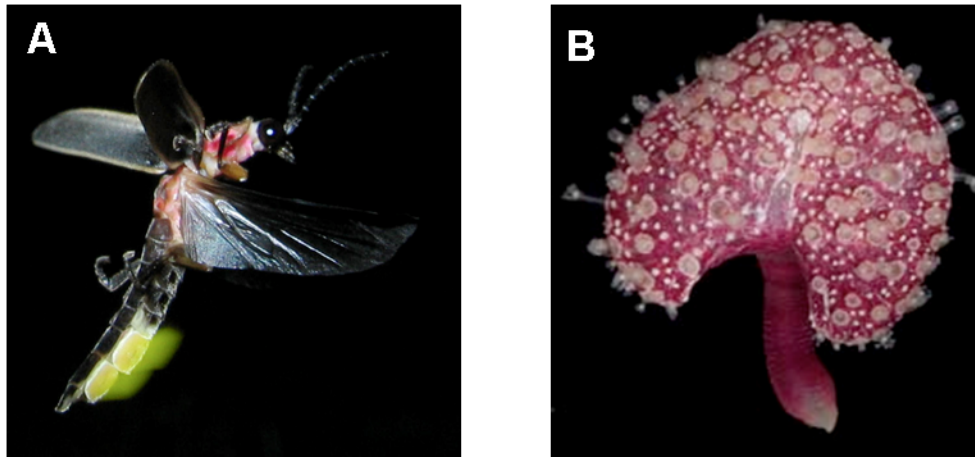


Figura 13: *Photinus pyralis* (A), *Renilla reniformes* (B).

1.2 Ventajas e inconvenientes de las luciferasas

Las principales ventajas del uso de luciferasas como trazadores celulares se pueden resumir en que:

- Se pueden integrar en el genoma celular, evitando que se diluyan con la proliferación celular
- La cantidad de fotones producidos es proporcional a la cantidad de células. La correlación lineal entre número de células y número de fotones nos permitirá evaluar el número de células en los implantes.
- Los mamíferos no presentan reacciones quimioluminiscentes, por lo cual el ruido de fondo es prácticamente nulo.
- Los instrumentos de detección de fotones, además de ser extraordinariamente sensibles, pueden detectar del orden de decenas de fotones, producen una respuesta lineal, proporcional al número de fotones incidentes¹⁶⁷.

Los principales inconvenientes de las luciferasas son la necesidad de utilizar un sustrato y que los tejidos vivos absorben la luz visible, lo que limita la profundidad a la que se pueden detectar las células marcadas dentro de los animales. Esta absorción de luz depende del tipo de tejido y de la longitud de onda, así, por ejemplo, la piel y el músculo son los tejidos que mejor dejan pasar la luz, en cambio, órganos con un alto contenido en hemoglobina, como son el hígado o el bazo, dejan pasar muy poca luz, ya que la luz es absorbida por la oxihemoglobina y la desoxihemoglobina de la sangre. La señal luminosa se reduce en término medio por un factor de 10 por cada centímetro de profundidad y esto varía en función del tipo de tejido, por lo que la máxima profundidad que permite la BLI es de 2-3 cm¹⁶⁸. Otro problema es que las imágenes obtenidas son bidimensionales, con lo que falta información de profundidad; con cámaras con dispositivo de carga acoplado (CCD, del inglés *Charged couple device*) rotatorio o con múltiples visiones del mismo animal solucionaríamos parcialmente este problema y se podría obtener una imagen volumétrica.

1.3 Uso de las luciferasas en modelos de terapia celular

Los diferentes tipos de luciferasas difieren mucho entre si, no existe actividad cruzada entre los sustratos de la RLuc y la PLuc, lo cual hace posible la utilización de las dos luciferasas en un mismo animal, permitiendo, el estudio simultáneo de diferentes procesos biológicos.

La utilización de la BLI para el seguimiento *in vivo* de células requiere de la modificación genética previa de las células. Básicamente, se dota a las células de interés, de la expresión de un gen trazador bioluminiscente (p. ej: RLuc y/o RLuc), bajo el control transcripcional de un promotor. Según el gen trazador y el promotor que usemos para regular la expresión del vector, podremos estudiar diferentes procesos, como por ejemplo la proliferación o los cambios en la expresión de genes de interés entre otros.

El uso de la BLI en modelos de terapia celular nos ha permitido conocer un poco mejor qué ocurre a nivel de diferenciación celular¹⁶⁹ con las células que implantamos. Para ello, las células son doblemente transfectadas, en primer

lugar con un gen que codifica para una proteína bioluminiscente (p.ej: RLuc) bajo el control transcripcional de un promotor de actividad constitutiva (activo continuamente) y en segundo lugar por un gen que codifica otra proteína bioluminiscente (p. ej: PLuc) bajo el control transcripcional de un promotor específico, que solo se activará en el proceso de diferenciación. La relación entre la luz producida por las dos luciferasas nos permite determinar tanto el número de células en el implante (obtenido a partir de la luz regulada por el promotor constitutivo), como el estado de diferenciación (obtenido a partir de la relación entre la emisión de luz regulada por el promotor constitutivo y la luz emitida por la luciferasa regulada por el promotor específico) (Figura 13).

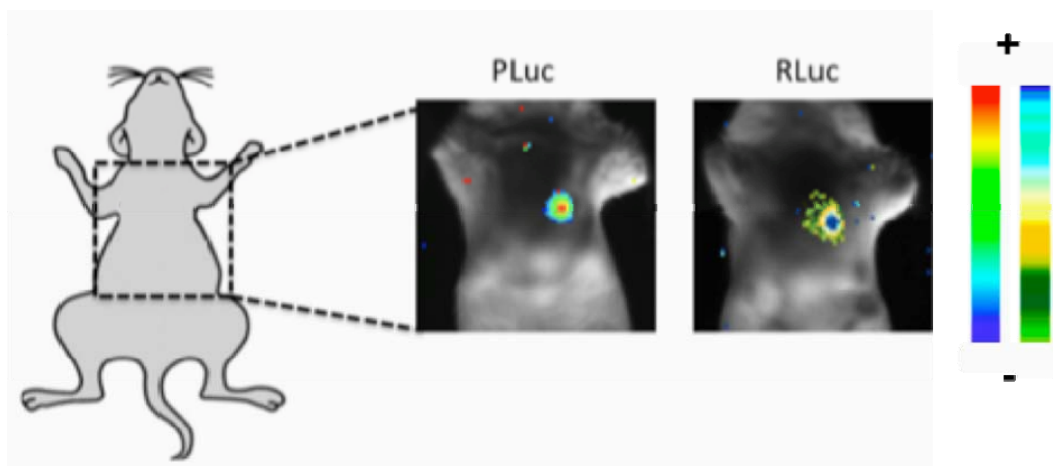


Figura 14: Ejemplo del tipo de imagen obtenida durante la monitorización con diferentes luciferasas. En este ejemplo, RLuc: luz regulada por un promotor de actividad constitutiva, sirve para determinar el número de células, mientras que PLuc: luz regulada por un promotor tejido específico, sirve para evaluar cambios en expresión génica. La relación entre la emisión de luz emitida por la luciferasa regulada del promotor constitutivo (control interno) y la luz emitida regulada por el promotor tejido específico nos permite determinar *in vivo* el cambio en la expresión de genes, independientemente del cambio en el número de células.

OBJETIVOS

PRINCIPAL

- Estudio y caracterización de un tipo celular derivado de células mesenquimales de tejido adiposo de elevada tasa proliferativa, para su uso en terapia celular.

Específicos

- i. Caracterizar la capacidad de crecimiento de las células fenotipo FP-MSC derivadas de células mesenquimales crecidas en medio EGM-2
- ii. Caracterizar las células FP-MSC en comparación con las células hAMSC; capacidad de diferenciación, marcadores de superficie y perfil de expresión génica.
- iii. Caracterizar el perfil de expresión génica de las células FP-MSC
- iv. Valorar la bioseguridad de las células FP-MSC.
- v. Explorar la aplicación de las células FP-MSC en terapia celular.



MATERIALES Y METODOS

I. EXPERIMENTACIÓN IN VITRO

1 . Tipos celulares

1.1 293T

La línea celular humana 293T, que deriva del riñón embrionario y expresa constitutivamente el antígeno SV40 large T, se obtienen a partir de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, EUA). Esta línea, altamente transfectable, se ha utilizado en esta tesis como empaquetadoras de virus, mediante transfecciones transitorias.

1.2 Células madre adulta mesenquimales derivadas de tejido adiposo (hAMSC)

Las hAMSC fueron obtenidas a partir de lipoaspirados subdérmico de pacientes con un índice de masa corporal superior a 25. El protocolo seguido para su aislamiento se describe a continuación:

- Lavar cinco veces el lipoaspirado con tampón fosfato salino 1X (PBS, Phosphate-buffered saline), e incubar con un volumen de colagenasa I al 0.075%(Sigma, Steinheim, Alemania) durante 30 minutos a 37° y con agitación.
- Inactivar la colagenasa con un volumen de DMEM (Dulbecco's modified eagle media-high glucose) (Sigma) al 10% de SBF (suero bovino fetal) (Sigma)
- Centrifugar a 450 g durante 10 minutos y lavar el precipitado con 50 ml de solución de Ringer.
- Resuspender con 10 ml de cloruro de amonio 0,16 M y dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos para lisar los eritrocitos.
- Centrifugar a 450 g durante 10 minutos y el precipitado se resuspende en medio completo (DMEM (Sigma) + 10% SBF (Sigma) + 1% penicilina-estreptomicina (P/S) (Sigma)).
- Sembrar en flascón y cultivar a 37°C , al 5% de CO₂

- A las 24 horas, retirar el medio para eliminar las células que no se han pegado y poner medio completo fresco

1.3 U87 MG

Las células U87 MG (ATCC) son una línea celular de astrocitoma derivada de gliomas malignos. El cariotipo es hipodiploide con un número modal de cromosomas de 44 en el 48% de las células y un ratio del 5,9% de elevada ploidia.

1.4 PC3

La línea celular PC3 (ATCC) se va a iniciar a partir de la metástasis en hueso de un adenocarcinoma de próstata de grado IV, de un hombre caucásico de 62 años. Esta línea es independiente de andrógeno y presenta casi una triploidia, con un número aproximado de 62 cromosomas.

2. *Condiciones y medios de cultivo*

Una vez establecidas los diferentes cultivos primarios, el medio de cultivo se cambia cada 3-4 días. Los cultivos se mantiene hasta llegar a un 70% de confluencia, se tripsinizan y se resiembran a una concentración de 2500 células viables/ cm². En todos los casos los cultivos se mantienen a 37° y 5% CO₂.

Los medios de cultivo empleado son los siguientes:

hAMSC

- DMEM 4500 glucosa (Sigma)
- 2 mM L-glutamina (Sigma)
- 50 u/ml P/S (Sigma)
- 10% SBF (Sigma)

FP-MSc (células mesenquimales estromales de alta capacidad proliferativa):

- Medio basal EBM-2 (Lonza)
- Suplementado con el conjunto de factores “EGM-2 SingleQuots”, que contiene: hEGF, Hidrocortisona, GA-1000 (Gentamicin, Amphotecerin B),

FBS (Fetal Bovine Serum) 10 mL, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, Ácido Ascorbico, Heparina

- 10% SBF (Sigma)
- Superficie cubierta con fibronectina humana (BD Biosciences) (10µg/ml diluida en PBS, incubar 30 minutos)

293-T

- DMEM 4500 glucosa (Sigma)
- 2 mM L-glutamina (Sigma)
- 50 u/ml P/S (Sigma)
- 10% SBF (Sigma)

PC3 y U87

- Mezcla 1:1 DMEM 4500 glucosa y HAM's F-12 (Sigma)
- 2 mM L-glutamina (Sigma)
- 50 µ/ml P/S (Sigma)
- 10% FBS (Sigma)

3. Estudio de diferenciación *in vitro*

3.1 Diferenciación adipogénica

Para la diferenciación *in vitro* de las células mesenquimales al linaje adiogénico, las células son cultivadas en medio de diferenciación *StemPro adipogenic differentiation Kit* (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA) y en las condiciones de cultivo recomendadas por el proveedor (www.invitrogen.com/support). Las células se cultivan a una densidad de 1×10^4 células/cm² en placas de 12 pocillos durante 14 días, cambiando el medio cada 3 días por medio fresco de diferenciación.

- Análisis de la diferenciación adipogénica:

Se utiliza el colorante liposoluble Oil Red O para la detección de triglicéridos, ácidos grasos y lipoproteínas intracelulares. Este colorante da una tinción rojiza.

Protocolo:

- Lavar las células con PBS 1X y fijarlas con paraformaldehído (Sigma) al 4% durante 1 hora.
- Lavar las células fijadas con isopropanol (Panreac s.a, Castellar del Vallès, España) al 60% durante 1 minuto.
- Teñir con solución Oil Red O (60 ml de la solución stock, que es una solución saturada de Oil Red O en isopropanol 100%, con 40 ml de agua destilada).
- Lavar dos veces con isopropanol 60% durante 1 minuto.
- Lavar con agua destilada durante 5 minutos.
- Observar al microscopio de contraste de fase.

3.2 Diferenciación osteogénica

Para la diferenciación *in vitro* al linaje osteogénico, las células mesenquimales son cultivadas en el medio de diferenciación *StemPro osteogenesis differentiation Kit* (Invitrogen), en las condiciones de cultivo recomendadas por el proveedor (www.invitrogen.com/support). Las células se cultivan a una densidad de 5×10^3 células/cm² en placas de 12 pocillos durante 14 días, cambiando el medio cada 3 días por medio fresco de diferenciación.

- Análisis de la diferenciación osteogénica:

Se basa en la detección de la deposición en el cultivo de matriz extracelular calcificada, característica típica de los osteoblastos, mediante la tinción específica con el colorante rojo de alizarina y posterior observación al microscopio de contraste de fase.

Protocolo:

- Retirar el medio osteogénico.
- Lavar 3 veces con PBS para eliminar los restos de medio y SBF.
- Fijarlas con PFA 4% durante 10min. a T^a ambiente.
- Lavar 3 veces con agua destilada

- Teñir con una solución al 1% de rojo de alizarina (Merk Inc, Darmstadt, Alemania) en agua destilada durante 10 min.
- Lavar 3 veces con agua destilada
- Observar al microscopio de contraste de fase.

4. Determinación del tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación medio de los diferentes tipos celulares, fue calculado en la fase de crecimiento exponencial, de acuerdo a la siguiente formula: $\text{Tiempo de duplicación} = \text{Tiempo (dias)} / \log_2 (N_2/N_1)$, donde N_1 es el primer recuento de células, y N_2 es el recuento de células al final de fase de crecimiento exponencial. El número total de células después de iniciarse el cultivo, fue medido mediante pases de células a una densidad de 2500 células/cm², hasta que se alcanzo la fase estacionaria.

5. Determinación de la entrada en senescencia

La entrada en fase de senescencia puede ser determinada por la detección la actividad β -Galactosidasa dependiente de pH. Para ello se empleo el kit comercial: *The Senescence Cell Histochemical Staining Kit (Sigma)*. Ambos tipos celulares fueron teñidos según las instrucciones del fabricante tanto en la fase exponencial como en fase estacionaria, incubándolas toda la noche a 37°C y sin CO₂.

6. Análisis de los marcadores de superficie por citometría de flujo

Se ha analizado el perfil de marcadores de superficie de las diferentes células en todos los pacientes, empleando la citometría de flujo. La citometría de flujo nos permite detectar, célula a célula, la presencia o ausencia de una determinada proteína, previamente marcada con un anticuerpo unido a una molécula fluorescente.

Se han estudiado los siguientes marcadores de superficie, todos ellos conjugados con ficoeritrina: CD49d, CD54, CD106, CD73, CD90, CD144,

CD13, CD44, CD29 (BD Biosciences, San Jose, CA), CD31, C-Kit, CD34, CD105 (Abcam,), VEGFR (R&D Systems, Minneapolis, MN), CD133 (Milteny).

Protocolo:

- Poner 100ml de suspensión celular, que contiene unas 10^5 células viables en tubos de propileno con fondo redondo de 4 ml para Coulter EPICS XL y lavar con 2 ml de PBS-BSA (1% BSA (Sigma))
- Centrifugar 5 min a 1300 rpm a T^a ambiente, decantar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet de células con 100 μ l de PBS-BSA.
- Añadir 10 μ l del anticuerpo o control isotópico, e incubar durante 1h a T^a ambiente y protegido de la luz. Agitar ligeramente los tubos cada 10min aproximadamente.
- Añadir 2ml de PBS-BSA y pasar por el agitador suavemente.
- Centrifugar 5 min. a 1300 rpm, y resuspende en 400 μ l de PBS-BSA
- Analizar con el citómetro Coulter EPICS XL. Se analizaron 10.000 células viables para cada marcador.

7. *Marcaje celular*

El marcaje estable de células con proteínas bioluminiscentes y fluorescentes, se ha realizado mediante vectores lentiviricos, ya que las células hAMSC tiene un ratio de división bajo.

7.1 *Vectores*

- El vector *pRRL-Luc-IRES-EGFP* nos fue cedido por el Dr. Alvarez-Vallina¹⁷⁰ Este vector contiene PLuc bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) seguido de un elemento IRES para la expresión de EGFP
- El vector *hrl-mrfp-tk* nos fue cedido por el Dr. S. Gambhir (Standford University, US) y contiene una quimera trifuncional que comprende RLuc, la proteína roja fluorescente monomérica (mRFP1) y una versión truncada de

la secuencia codificante de la timidin quinasa del virus del herpes simple (sr39tk) regulada por el promotor CMV¹⁷¹.

- El vector *PLox:hPECAMp:PLuc:eGFP*, que expresa la quimera PLuc y EGFP regulada por el promotor específico endotelial PECAM fue construido en nuestro laboratorio por J.R. Bagó. En primer lugar el vector lentivírico *pLox:PLuc:eGFP* que contenía el gen indicador de fusión PLuc y EGFP, se obtuvo por amplificación (PCR) y protocolos estándar de clonaje utilizando los genes PLuc y EGFP de los plásmidos *pGL4.10:PLuc* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y *pEGFP-N1* (Clontech Lab., Palo Alto, CA, USA). En un segundo paso, *HPCAM-1p* proporcionado por el Dr. Carmelo Bernabéu (Centro de Investigaciones Biológicas CSIC, Madrid) se clonó en *pLox:PLuc:eGFP* utilizando las enzimas *XbaI/Spel* y *Spel* respectivamente.

- El vector *PLox:hcTnPIp:PLuc:eGFP*, que expresa la quimera PLuc y EGFP regulada por el promotor específico del gen de la troponina I humana (*hcTnPIp*) fue construido en nuestro laboratorio por J.R. Bagó. Igual al anterior, pero en el segundo paso, *hcTnPIp* se clonó en el plásmido *pCR2.11*, y de aquí se extrajo utilizando las enzimas *XbaI/Spel* y se clonó en el vector *pLox:PLuc:eGFP* previamente digerido con *Spel*.

-El vector *CDUPRT:puro*, que expresa la quimera fusionada de la Cytosina deaminasa y la Uracilo Fosforibosiltransferasa regulada por el promotor híbrido EF-1 α / HTLV, y el gen puro que confiere resistencia a la puomicina bajo control del promotor constitutivo de PGK, permitiendo una selección de transfección. La proteína quimérica CDUPRT se extrajo del plásmido *pORF-codA::upp* (Invivogen, San Diego, CA, USA) y se clonó en el vector lentivírico *pLVX-PURO* (Clontech, Mountain View, CA, USA).

7.2 Producción de partículas víricas

Protocolo:

- Sembrar 3×10^6 células 293T en plaques de 10 cm^2 de superficie con $5 \mu\text{g/ml}$ de poli-D-lisina (Sigma) para aumentar la adherencia de las células al plástico.
- 24h después y 2 h antes de la transfección de las células, cambiar el medio y poner 9 ml de medio fresco.
- El vector de transferencia, con los diferentes genes clonados, el plásmido de envoltura pMD-G-VSV-G *env* y el plásmido de empaquetamiento pCMVDR8.2, se mezclan en una proporción de $20 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ y $15 \mu\text{g}$, respectivamente, con H_2O estéril hasta un volumen final de $450 \mu\text{l}$.
- Añadir $50 \mu\text{l}$ de cloruro de calcio (Sigma) $2,5 \text{ M}$, previamente calentado a temperatura ambiente, a la mezcla de ADN y H_2O .
- Con una pipeta Pasteur, añadir esta mezcla, gota a gota, a $500 \mu\text{l}$ de HEPES 2X (pH 7) a temperatura ambiente y en agitación, y dejar inmóvil durante 20 min.
- La mezcla final se añade, también gota a gota, sobre la placa sembrada con 293T, mientras se va moviendo ligeramente. Se deja en el incubador a 37°C y al 5% de CO_2
- Dejar las células y el precipitado durante 16h a 37°C i al 5% de CO_2 .
- Después de 16h de cultivo, se retira el medio con el precipitado, se lavan las células con PBS 1X y se añade medio de cultivo sin SBF.
- 48h después, se recoge el medio y se centrifuga a $400 \times g$ durante 10min para eliminar los restos celulares y el sobrenadante es filtrado por un filtro de $0,45 \mu\text{m}$. Posteriormente, se hace una ultracentrifugación a 26.000 rpm a 4°C durante 90 min. con un rotor SW41.Ti en una ultracentrífuga L-100xp (Beckman Coulter, Fullerton, EUA) para concentrar los virus.
- El precipitado obtenido se resuspende con PBS 1X (con Mg^{2+}) y se congela en alícuotas a -80°C .

7.3 Titulación de partículas víricas

La titulación de las partículas víricas se hace mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) del antígeno p24 del VIH (EIA, Beckman Coulter).

-Alícuotas de las muestras y de los controles se disponen en una placa de 96 pocillos junto con el tampón de lisis, y se incuba durante 1h a 37°C. Se aspira el medio y se lava los pocillos con el tampón de lavado 6 veces durante 30seg.

-Añadir 200 µl de reactivo de biotina anti-VIH-1 humano resuspendido, a excepción del pocillo utilizado como blanco, y dejar 1 hora a 37°C. Seguidamente, aspirar el medio y lavar los pocillos 6 veces durante 30seg. con el tampón de lavado

-Añadir 200 µl de SA-HRPO (conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano) a todos los pocillos a excepción del blanco e incubar a 37°C durante 30 min. Lavar los pocillos, como se ha hecho previamente.

-Finalmente, añadir el reactivo TMB (que contiene tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno) e incubar en oscuridad 30 min. Se para la reacción mediante la adición de ácido CSR-1 (4NH₂SO₄).

-La absorbancia de la coloración se mide con un espectrofotómetro a 450/570 nm. Los resultados se obtienen en pg/ml de cantidad de proteína VIH-1 p24. En nuestro caso, se obtiene que 10 ng de p24 corresponden a 10⁶ unidades transfectadas (TU).

7.4 Transducción celular

Para marcar las células de manera permanente mediante el uso de partículas lentivíricas, se realizó el siguiente protocolo

- Se siembran las células mesenquimales a 5000 células/cm² en placas de 12 pocillos.

- Al medio de las células, que contiene polybrene (*hexadimethrine bromide*) a una concentración final de 10 µg/ml, se le añade el virus concentrado para obtener una MOI (Multiplicidad de Infección, partículas víricas infecciosas/célula) de 20 (2 x 10⁶ TU/ml) en un volumen final de 500 µl.

- Se deja el medio de transducción durante 24h. Se realizan lavados con PBS 1X, se añade medio nuevo y se dejan crecer las células.

- La eficiencia de transducción vírica se determina por la detección de proteínas fluorescentes mediante microscopia de fluorescencia o por citometría de flujo.

Selección de células transducidas.

Las células positivas por fluorescencia, se seleccionan mediante la separación de células activada por fluorescencia (FACS). Se seleccionan del 11% al 5% más marcado, dependiendo de la capacidad proliferativa del tipo celular.

8. Ensayo de formación tubulogénica in vitro en Matrigel

El Matrigel™. (BD Bioscience) es una matriz habitualmente empleada para evaluar la capacidad de diferenciación a células endoteliales, mediante la formación de estructura tubulogénicas *in vitro*. El matrigel es una mezcla proteica gelatinosa secretada por las células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), que contiene componentes de la membrana basal, enzimas proteolíticas, inhibidores y factores de crecimiento. A temperatura ambiente el matrigel solidifica y debe manipularse a 4°C de la siguiente forma:

- Se añaden 50 µl de solución de Matrigel TM por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- Se siembran 1×10^4 células en EGM-2 (Lonza) en los pocillos recubiertos de Matrigel.
- Cada hora se toman imágenes de diferentes campos de los pocillos por microscopia de contraste de fase. La formación de tubos se monitorizó durante 8 horas.
- Las estructuras que se cuantifica por la capacidad de formar círculos completamente cerrados (*Círculos/mm²*).

9. *Extracción de ADN genómico y ARN*

El ADN genómico de las células necesario para las CGH fueron extraído con el kit FlexiGene DNA kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante (http://www.qiagen.com/hb/flexigenednakit_en)

El ARN total de las células, que necesitaremos para los Microarrays y RT-PCR, fueron aislados con el kit RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante (http://www1.qiagen.com/HB/RNeasyPlusMicroKit_EN)

10. *Hibridación Comparativa de Genoma (CGH)*

El ADN genómico extraído fue analizado gracias a la colaboración de Rigola M.A. y Fuster C, mediante el método descrito por ellas¹⁷²:

- El ADN de los controles normales y de las células de interés (hAMSC y FP-MSC de pase 3 y pase 7) fueron marcadas con Spectrum Green-dUtp y Spectrum Red-dUTP según las indicaciones del kit comercial (Vysis, Downers Grove, IL, USA).
- Se tomó la misma cantidad de ADN control y ADN de las células estudiadas marcado (500 ng) y 10 µg de ADN Cot-1 y se co-precipitaron usando etanol.
- El ADN precipitado se disolvió en 12µl de tampón de hibridación y se desnaturalizo a 74°C durante 8 minutos.
- Las metafases normales (Vysis) fueron desnaturalizadas a 74°C durante 5 min. e hibridizadas con la mezcla de ADN en una cámara húmeda durante 2-3 días.
- Los portaobjetos se lavaron de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante
- Los cromosomas se tiñeron con DAPI, resultando un patron de bandas-G, que se utilizó para identificación de los cromosomas.
- Los portaobjetos fueron analizados utilizando el software V5.C Metasystems Isis (Metasystems). Las señales de hibridación fluorescente y los patrones de tinción DAPI fueron analizados. El software realiza un cálculo del ratio del ADN de nuestras células frente al ADN

control, a lo largo de la longitud de cada cromosoma. Los valores de la relación obtenida a partir de al menos 19 metafases se promediaron, y los perfiles resultante se representaron junto a los ideogramas de los cromosomas. Valores de la relación por encima de 1.25 y por debajo de 0.75 se considera que representan ganancias y pérdidas cromosómicas, respectivamente

11. Microarrays y análisis de datos

Los microarrays fueron realizados en la plataforma “Functional Genomics Core Facility” del IRB (*Institute for Research in Biomedicine*), en el Parc Científic de Barcelona. A continuación se detalla el protocolo que llevaron a cabo.

El ARN total de nuestras muestras, extraído según el punto 9, fue analizado con “Agilent RNA 6000 Nano Kit” para comprobar su calidad y cuantificarlo, y con “Agilent 2100 Bioanalyser” para realizar la electroforesis capilar y determinar el tamaño, la cuantificación y la calidad del ARN.

El sistema de microarrays de Affymetrix se basa en la amplificación de moléculas de ADN sentido biotiniladas, que hibridan con chips que contienen un set de sondas diferentes para cada transcrito. Se utilizaron los GeneChip® Gene 1.0 ST Array (Affymetrix), que reconocen 28.869 genes mediante unas 26 sondas distribuidas a lo largo de cada transcrito. El protocolo de obtención del ADN fragmentado y marcado, a partir del ARN, mediante el TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma; WTA2), se resume a continuación:

- 25ng de ARN total fue amplificado con 17 ciclos de amplificación, utilizando “TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification Kit” (Sigma; reference WTA2). 8µg de cDNA fueron fragmentados por DNaseI, y posteriormente biotinilado por transferasa terminal obtenido del “GeneChip Mapping 10K Xba Assay Kit” (Affymetrix; catalog # 900441), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 8µg de cDNA marcado de cada muestra fue hibridado con “Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0ST”, de acuerdo con el manual descrito en “Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Manual” (Fluidics protocol FS450_007)
- Los arreglos fueron digitalizadas en un escáner GeneChip 3000 (Affymetrix)
- Los archivos CEL fueron generados a partir de los archivos DAT usando el software del SMOC (Affymetrix).
- Las señales normalizadas de expresión fueron calculadas a partir de los archivos CEL de Affymetrix utilizando RMA (Robust Multichip Average)¹⁷³

Los resultados se analizaron con el programa Partek Genomics Suite. Mediante este programa se normalizaron los p-valores por el método de Benjamini-Höcherberg, y se filtraron los resultados según el FDR y el Fold Change (FC). A continuación, los resultados se analizaron a nivel funcional mediante el programa y base de datos “Ingenuity Pathway Analyse” (IPA).

12. PCR a tiempo real

Esta técnica nos permite medir cuantitativamente el número total de diferentes mARNs en una muestra.

Procedimiento:

- Partimos de la misma extracción de ARN total empleado para los Microarrays.
- El ARN obtenido se cuantificó con el espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).
- Retrotranscripción: La obtención de cADN se realizó a partir de 2 µg de ARN y siguiendo el protocolo descrito en el kit *Script One-Step RT_PCR kit* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Volumen final de la reacción: 50 µl

MATERIALES Y MÉTODOS

- 25 µl 2X RT-PCR reaction
 - (21,5-X) µl H₂O libre de nucleases
 - X µl RNA (~2 µg)
 - 2,5 µl (≈250 nM) Random hexamers (50 µM)(Qiagen)
 - 1 µl iScript Reverse Transcriptase (50X)
- y con las siguientes condiciones del termociclador (Bio-Rad):
- 10 min a 25°C (alineamiento de hexámeros)
 - 10 min a 50°C (síntesis de ADNc)
 - 5 min a 95°C (inactivación de la transcriptasa inversa)

Las amplificaciones se realizaron con 2 µl de ADNc y en un volumen final de 50 µl que contenía:

- 21 µl H₂O estéril
- 25 µl TaqMan 2X *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA)
- 2 µl cADN
- 2 µl sonda (primers)**

**Todas las sondas utilizadas se adquirieron en Applied Biosystems:

- Genes de expresión constitutiva:
 - gliceraldehid 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Hs99999905_m1)
- Genes seleccionados como perfil de las FP-MSc
 - cannabinoid receptor 1 (brain) (CNR1) (Hs01038522_s1)
 - amphiregulin (AREG/AREGB)
 - ephrin-B2 (EFNB2) (Hs00187950_m1)
 - FK506 binding protein 5 (FKBP5) (Hs01561006_m1)
 - hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 (HSD11B1) (Hs01547870_m1)
 - prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa (PTEGR2) (Hs00168754_m1)

- hepatocyte growth factor (hepatopoietin A; scatter factor)(HGF) (Hs00300159_m1)
- carboxypeptidase M (CPM) (Hs01074151_m1)
- monoamine oxidase A (MAOA) (Hs00165140_m1)
- zinc finger and BTB domain containing 16 (ZBTB16) (Hs00957433_m1)
- arachidonate 15-lipoxygenase, type B (ALOX15B)(Hs00153988_m1)
- chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20) (Hs01011368_m1)

Análisis de los datos:

Los datos obtenidos se analizaron con el programa *ABI Prism 7000 Sequence Detection System*. La cantidad relativa obtenida del gen diana se calculó con el método de la curva estándar utilizando el gen GAPDH como referencia. Las comparaciones por lo que se refiere a los niveles de expresión relativa entre las diferentes muestras se hicieron con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak et. al.¹⁷⁴

13. Ensayo de viabilidad

Para determinar la viabilidad celular utilizamos el kit comercial “CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay” (Promega). Es un método colorimétrico que determina el número de células viables en proliferación o en ensayos citotóxicos. Se basa en una reacción de reducción por las células de uno de sus componentes, dando un producto coloreado que se puede detectar en un espectrofotómetro de placas.

Protocolo:

- Se añade 20µl de producto en cada pocillo, que contiene las células en 100µl de medio.
- Incubar 4 horas a 37° y 5%CO₂.
- Leer en un espectrofotómetro de placa, a 490nm de absorbancia.

II. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

1. Ratones

Los animales que se han utilizado a lo largo de esta tesis se han mantenido en un ambiente libre de patógenos. Todos los procedimientos con animales aplicados a lo largo de los diferentes estudios han sido aprobados por el comité ético del Centro de Investigación Cardiovascular (CIC) y por la Generalitat de Catalunya. Los investigadores han seguido la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Research* (Publicación del NIH nº 86-23, Revisión de 1996).

1.1 Ratones SCID

Los ratones SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) se caracterizan por la incapacidad de crear una respuesta inmune apropiada a causa de la ausencia o el funcionamiento defectuoso de los linfocitos T y B, debido a una mutación recesiva en el cromosoma 16. A nivel funcional, esta mutación provoca que el sistema inmunológico no madure y estos ratones no pueden combatir infecciones ni rechazar tumores o trasplantes.

2. *Implantación de células humanas hAMSC y FP-MSC en ratones SCID*

Para poder evaluar la seguridad de las hAMSC y de las FP-MSC de pase temprano y tardío. Se desarrolló un modelo ectópico intramuscular (IM), en el cual se inocularon células humanas en las patas traseras de los ratones. El procedimiento fue el siguiente:

-Se tripsinizaron las células de manera que quedaran a una concentración final de 5×10^5 células GLuc-hAMSC en 50 μ l de DMEM 4500 glucosa y se guardaron en hielo hasta que se inocularon a los animales.

-Se anestesiaron los animales mediante una inyección intraperitoneal (IP) con 100 mg/kg de ketamina (Merial, Duluth, EUA) y 3,3 mg/kg de xilacina (Henry Schein, Melville, EUA).

-Para la inoculación IM, se inmovilizaron los animales y se inyectaron 50 μ l de la suspensión celular con una punción IM en cada pata trasera.

3. Implantación de células humanas en el cerebro de ratones SCID

Para los experimentos *in vivo* se desarrolló un modelo ortotópico de inyección de U87 y hAMSC o FP-MSC (en combinación o solas) en el cerebro de ratones SCID de 6 semanas. Se siguió el siguiente protocolo:

-Los animales se anestesiaron por inyección IP de 3.3 mg/kg de xilacina (Henry Schein, Melville, NY,USA) y 100 mg/kg de ketamine (Merial, Duluth, GA, USA).

-Los ratones se colocaron en un aparato estereotáctico (Stoelting, Wood Dale, IL, U.S.A.) y se fijaron las cabezas utilizando una pinza nasal y dos barras para las orejas. Se realizó un corte en la piel para exponer la superficie del cráneo y se administró fentanilo (Kernpharma, Barcelona, Spain).

-Para la implantación estereotáctica de las células se realizó un agujero en las siguientes coordenadas (posterior 0,6 mm, lateral 2mm y una profundidad de 2,75mm respecto a Bregma).

-Las inyecciones se realizaron a una velocidad de 0.25 μ l/min con un volumen de 4 μ l utilizando una jeringa Hamilton serie 7000 y la aguja fue lentamente retirada tras esperar 5 minutos adicionales.

-El cuero cabelludo fue cerrado por sutura y los animales se colocaron individualmente en jaulas para su recuperación. Se suplementó el agua con buprenorfina (Buprex, Schering Plough SA, Madrid, Spain).

4. Establecimiento de gliomas

Para la implantación ortotópica de gliomas se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección anterior. Las U87 que se implantaron en los diferentes estudios expresaban PLuc.

5. Inyecciones mixtas de células tumorales y hAMSC/FP-MSc en ratón

Para determinar la eficiencia terapéutica en los estudios con hAMSC y con FP-MSc, se inyectó una mezcla de células tumorales y hAMSC/FP-MSc en proporción 1:4, siguiendo el protocolo de la sección 3 en un volumen total de 6 μ l.

6. Modelo de tumores ectópico de PC3 en ratones SCID

La producción de tumores ectópicos se realizó siguiendo el mismo protocolo de implantación IM de células humanas en ratones del apartado 2. Las células tumorales de próstata que se inocularon estaban marcadas con RLuc.

7. Modelo in vivo de infarto de miocardio

El modelo de infarto de miocardio en ratones se realiza mediante la ligadura permanente de la arteria coronaria anterior izquierda descrita por primera vez en un modelo de rata realizado por Pfeffer et. al. el 1979¹⁷⁵ y más adelante en el modelo de ratón realizado por Michael i col. el 1995¹⁷⁶. En estos modelos, los cambios histológicos después de una oclusión total coronaria son similares a los observados en humanos después de un IAM (infarto agudo de miocardio) no tratado, pero en cambio, se desarrollan en un marco temporal más breve y incluyen una menor infiltración de células polimorfonucleadas^{177 178}

Nuestro estudio se realizó en ratones hembra SCID de 15 semanas de edad y de un peso comprendido entre 20 y 24g (Charles River laboratories inc, Wilmington, Mass, EUA). Los animales se alimentaron *ad libitum*.

Material:

- 2X Pinzas Adson (FST, Fine Science Tools, Vancouver, Canadá) rectas de 12cm de longitud total.
- 2X Pinzas Bishop-Harman serradas de 8,5 cm de longitud total (FST)
- 1X Pinzas Supergrip (punta amplia) (FST)
- 2X Portagujas Cohan–mini curvados.
- Pinzas i tijeras.
- Pomada oftalmológica.
- Sutura Ethicon Cardiovascular (Johnson-Johnson comp., Nwe Brunswick, NJ, EUA) de 7-0 de seda negra con dos agujas por sutura del tipo BV-1.
- Sutura monofilamento de polipropileno de 6-0 no reabsorbible con dos agujas Ethicon del tipo C-1.
- Lidocaína inyectable (1%), 100 ml. Vedco (St. Joseph, MO, EUA)
- Buprenorfina, Buprex (Schering Plough Corp., Kenilworth, New Jersey, EUA) 0,3mg.
- Cola quirúrgica intraoperatoria. GLUBRAN2 (GEM, S.r.l.).
- Cola quirúrgica Histoacryl® (Braun, Kronberg, Alemania)
- Dispensador de isofluorano y tanque de oxígeno.
- Lupa
- Respirador con control de presión, modelo TOPO (Kent Scientific Corporation, San Diego, CA, EUA)

7.1 Procedimiento quirúrgico en modelo de infarto

Procedimiento:

- Anestesiarse al ratón con isofluorano utilizando el vaporizador. Para hacerlo se coloca al animal en una cámara de aislamiento y se realiza la inducción durante 1 minuto aproximadamente con 5% de isofluorano en 100% de oxígeno. Seguidamente se suministra un 2% de isofluorano en 100% de oxígeno mediante un cono nasal y se mantiene la anestesia para que el animal respire espontáneamente. Se aplica solución o pomada oftalmológica para evitar sequedad en los ojos.
- Rasurar el cuello y el costado izquierdo del pecho del ratón.

- Limpiar las áreas con solución yodada y etanol 70%.
- Inyectar buprenorfina (0,1-0,5 mg/Kg) subcutáneamente como analgésico.
- Para la intubación, se expone la tráquea con la finalidad de visualizar correctamente el recorrido del tubo y evitar introducirlo en el esófago. Se hace una incisión de 0,5 cm en el cuello (0,5 cm por debajo de la boca) y se separa la piel, las glándulas y la musculatura que envuelve la tráquea con los retractores (Figura 15). Se sujeta la lengua del ratón con unas pinzas curvadas y se mueve hacia un costado. Suavemente se introduce por la tráquea el tubo del respirador (20G). En caso de dificultades para introducir el catéter, se aplica, con un pincel, una solución de lidocaína 1% en la tráquea.
- Configurar el respirador a 90 respiraciones/minuto y a un volumen de 0,1 ml para un ratón de 30g. Se ventila al animal con 2% de isoflurano en 100% de oxígeno durante todo el procedimiento quirúrgico. Se sacan los retractores y se hidrata la herida con solución salina para evitar la sequedad hasta que se suture al final de la cirugía.
- Realizar una incisión vertical de 1cm paralela al esternón en el lado izquierdo del animal y se retiran los músculos pectorales subyacentes. Se expone el corazón entrando en la cavidad pectoral a través del cuarto espacio intercostal retirando las costillas adyacentes (Figura 15).

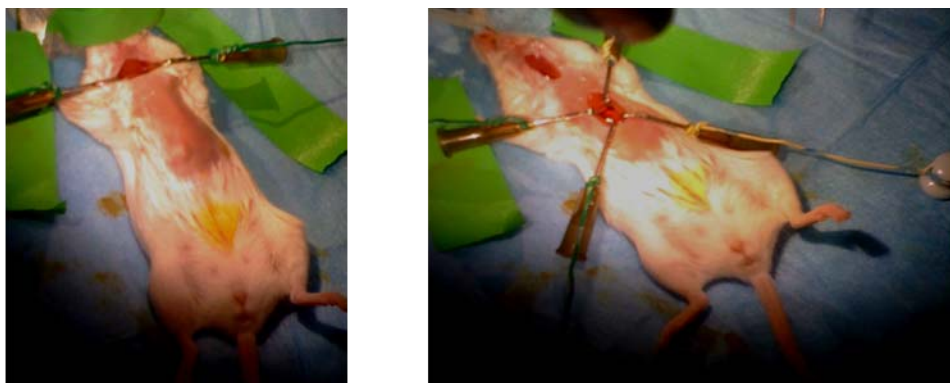


Figura 15: Izquierda, exposición de la tráquea para la posterior intubación. Derecha, incisión vertical para la exposición del corazón.

-Pellizcar el pericardio con los fórceps Bishop-Harman y realizar un pequeño agujero para retirarlo. Localizar la arteria coronaria descendente anterior izquierda y ocluir la ligándola con una sutura de 7-0 (haciendo un doble nudo y dos simples) para provocar un infarto de miocardio (MI) (Figura 16). El tejido situado por debajo de la ligadura se volverá pálido (Figura 17). Es importante realizar la ligadura a más de un milímetro de la aurícula, de otra forma el infarto será demasiado grande para que el animal sobreviva.

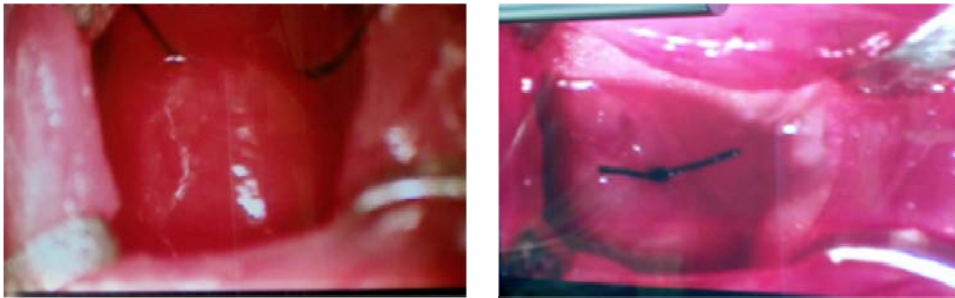


Figura 16: Izquierda, sutura que envuelve la arteria coronaria descendente. Imagen derecha, sutura con un doble nudo y dos simples ocluyendo la arteria coronaria descendente.

-Colocar sobre la zona infartada la matriz de fibrina que incluye las células a estudiar. Con tal de asegurar que la matriz queda adherida a la zona de la lesión, se fija al corazón utilizando cola quirúrgica (GLUBRAN2, GEM, S.r.l., Viareggio, LU, Italia).

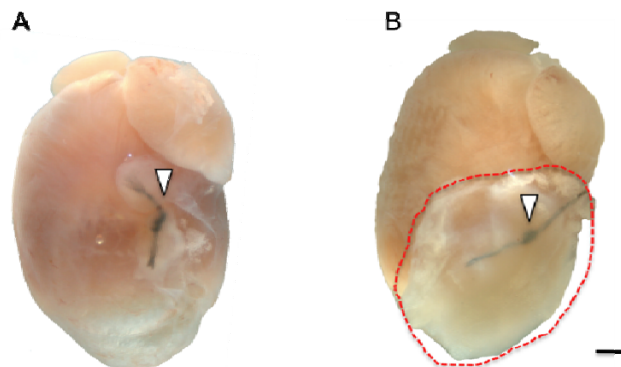


Figura 17: Corazón de ratón infartado después de la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (A) (la flecha indica la zona de la ligadura). Implante de fibrina con células sobre la zona de la lesión (B (perímetro indicado en rojo). Barra a escala 1mm.

-Cerrar el pecho del animal, primero suturando las costillas adyacentes entre ellas y después la piel como segunda capa utilizando prolene 6-0 (Figura 18). De manera gradual, se reduce el porcentaje de isoflurano mientras se cierra el animal para que la recuperación sea más rápida.



Figura 18: Sutura de las costillas adyacentes (izquierda) y sutura final (derecha).

-Inyectar 0,5 ml de solución salina subcutáneamente para prevenir la deshidratación del animal. Después de apagar la anestesia, se retira el catéter de la tráquea y se ventila el animal con oxígeno 100% hasta que recupera el conocimiento. Con tal de contrarrestar la posible hipotermia provocada por la anestesia se mantiene al animal caliente con una manta calefactora.

-Realizar un seguimiento de la herida, administrar analgésicos y tratar posibles infecciones con un antibiótico (administración parental de enrofloxacina (Baytril®, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Alemania) 85 mg/Kg durante 14 días).

7.2 Cirugía aguda terminal

La cirugía aguda terminal se realiza a los 30 días post implantación con el fin de quitar los corazones de los ratones para su posterior análisis.

Procedimiento:

-Anestesiarse al animal con anestesia inhalada isoflurano al 5% utilizando el vaporizador.

-Abrir la cavidad pectoral y poner el corazón con la solución hipercálmica fría de Krebs-Henseleit modificada** (contiene butanodiona monoxima para

bloquear la contracción) inyectándola en el ventrículo izquierdo a través del ápex. Hay que tener cuidado en evitar la sobrecarga del ventrículo izquierdo (0,3-0,5 ml). Este método de eutanasia asegura que el corazón esté en el estado fisiológico necesario para los estudios histológicos del corazón aislado (diástole).

-Extracción del corazón y fijarlo en PFA al 4% durante un mínimo de 24h a 4°C. Posteriormente se mantienen en una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta la saturación con el objetivo de criopreservarlos. Para su conservación y posterior análisis histológico se cortan de manera transversal a la altura de la ligadura, obteniendo un segmento basal y uno apical. Seguidamente se incluyen en OCT (tissue-tek®, SAKURA, Torrance, CA, EUA) y se congelan de manera inmediata en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Rápidamente son almacenados en el congelador a -80°C.

**Solución de fijación de Krebs-Henseleit modificada (100ml):

-NaCl 0,4g

-KCl 0,44g

-Glucosa 0,2g

-NaHCO₃ 0,01g

-BDM 0,3g

-Heparina (1000U/ml) 1ml

Nota: Mantener la solución fría i prepararla fresca cada vez.

III. SISTEMA DE ANÁLISIS

1. Imagen por bioluminiscencia (BLI)

Procedimiento:

- Anestesiarse el ratón mediante una inyección IP con 100 mg/Kg de ketamina y 3,3 mg/Kg de xilacina.
- Administrar el sustrato: IP la luciferina, sustrato de la PLu; IV a través de la vena caudal la colenterazina (CZN), sustrato de la RLuc.
- Inmovilizar al ratón sobre una pieza de metacrilato de color negro y colocarlo a una determinada distancia del objetivo de la cámara (HFP-Schneider Xenon 0,95/25 mm) de alta eficiencia ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japón). En cada estudio se mantiene la distancia, pero ésta es diferente entre los diversos estudios. La distancia utilizada depende tanto del área del animal donde se quiere detectar la presencia de células como de la intensidad de la señal que producen estas células. Para todos los estudios, el objetivo de la cámara se encuentra en la máxima apertura.
- Tomar una imagen del campo claro durante 125 mseg. y con un binning 1x1.
- Inmediatamente después y sin mover la posición del animal, tomar una imagen en oscuridad total, donde sólo se captan los fotones de luz emitidos por las células implantadas en el ratón. El tiempo y el binning utilizados son diferentes para cada procedimiento y dependen tanto de la cantidad de células como de los fotones emitidos por cada una de estas células.

1.1 Cuantificación de fotones a partir de las imágenes

La cuantificación de fotones detectados en cada imagen se hace mediante el programa de análisis de imagen Wasabi (Hamamatsu Photonics). Los resultados se expresan como cuentas fotónicas (PHCs, *photon counts*).

Procedimiento:

Mediante el programa Wasabi se define el área de interés donde se quiere realiza el cálculo de fotonos totales y se extrae de la memoria de la imagen los PHCs captados. De esta manera se obtiene un número total de PHCs del área de estudio. Simultáneamente se extrae el número del total de PHC de un área de la misma imagen donde no haya señal detectable. Esto se conoce como ruido de fondo.

El cálculo neto de PHC del área que se quiere estudiar se hace aplicando la siguiente fórmula:

$$PHC = (PHC \text{ totales del área de interés}) - [(media \text{ de PHC del ruido de fondo}) \times (\text{número total de píxeles del área de estudio})]$$

En los estudios donde ha sido necesario, se normalizan todos los valores de PHC obtenidos durante el experimento respecto a los del día inicial.

2. Análisis funcional: Ecocardiograma

La función cardíaca de los ratones se evaluó mediante ecocardiografía transtorácica realizada con un ecocardiógrafo (Vivid 7, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, GB) equipado con un transductor lineal de 10 MHz. Se realizaron medidas basales (1 día antes del MI) post IAM (2 días después de MI) y 3 semanas post MI. Se realizaron ecocardiografías modo M y bidimensionales a nivel de los músculos papilares en la visión paraesternal del eje largo (Figura 19).

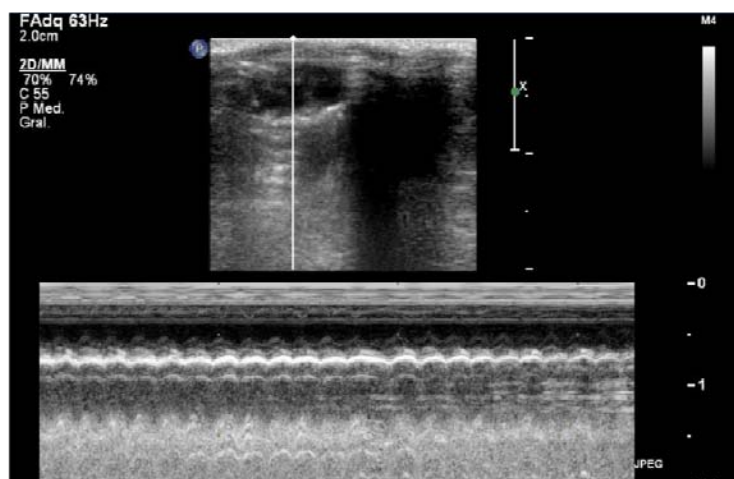


Figura 19: Ecocardiograma en modo M del músculo papilar en la visión del eje largo.

Los parámetros funcionales se calcularon a partir de 5 ciclos consecutivos utilizando métodos estándar¹⁷⁹. Se cuantificaron las dimensiones (volumen (V), área (A) y diámetro (D)) del ventrículo izquierdo en telesístole (VEs) y telediástole (VEd) para el cálculo de la fracción de eyección (FE) según:

$$FE = \left[\left(\frac{VVEd - VVEs}{VVEd} \right) \right] \times 100$$

3. *Inmunofluorescència*

Con el objetivo de identificar *ex vivo* las células implantadas en el parche de fibrina y determinar su expresión proteica, se realizan diferentes inmunofluorescencias siguiendo el siguiente protocolo:

- Secar las secciones con la ayuda de un ventilador durante 30 min.
- Poner las secciones en una cámara húmeda.
- Lavar las secciones 2 X 5 min en TBS.
- Lavar las secciones 3 X 10 min en TBS + 0, 5% Tritó-X100 (0, 5% TBS-T).
- Bloquear durante 1 h en solución de bloqueo (1% BSA + 5% NDS en TBS-T).
- Incubar las secciones con el anticuerpo primario en la dilución necesaria (tabla x) en solución de bloqueo O/N a 4°C en una cámara húmeda.
- Atemperar durante 1 h a temperatura ambiente.
- Lavar las secciones 3 X 5 min en 0, 5% TBS-T.
- Incubar las secciones con el anticuerpo secundario (tabla x) conjugado con un fluoróforo a la dilución necesaria en TBS durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda protegida de la luz (Proteger las secciones de la luz hasta el final del protocolo).
- Lavar las secciones 3 X 5 min en TBS.
- Incubar con Hoechst (Sigma) (1 g/ml) durante 15 min en una cámara húmeda.
- Lavar las secciones 2 X 5 min en TBS.
- Montar en medio FluoromountTM (Sigma).

Anticuerpos primarios:

Antígeno reconocido	Especie huésped	Dilución	Casa comercial
<i>Troponina I cardíaca</i>	Ratón	1:100 (36µg/ml)	Abcam ab19615
<i>CD31</i>	Conejo	1:50 (4µg/ml)	Abcam ab2864
<i>α-actinina sarcomérica</i>	Ratón	1:100 (no especificado)	Sigma A7811
<i>RFP</i>	Rata	1:50 (2mg/ml)	Chromotek ref.5F8
<i>RFP</i>	Conejo	1:50 (10µg/ml)	Abcam ab62341
<i>GFP</i>	Pollo	1:200 (5µg/ml)	Abcam ab13970
<i>GFP</i>	Cabra	1:50 (20µg/ml)	Abcam ab66773

Anticuerpos secundarios:

Especie reconocida	Especie huésped	Dilución	Marcaje	Casa comercial
Conejo	Burro	7,5µg/ml	Cy5	Jackson ImmunoResearch ref. 711-175-152
Ratón	Burro	7,5µg/ml	Cy5	Jackson ImmunoResearch ref. 715-175-151
Rata	Burro	7,5µg/ml	Cy3	Jackson ImmunoResearch ref. 712-165-150
Conejo	Burro	7,5µg/ml	Alexa 549	Jackson ImmunoResearch ref. 711-505-152
Pollo	Burro	7,5µg/ml	DyLight 488	Jackson ImmunoResearch ref. 703-485-155
Cabra	Burro	7,5µg/ml	Cy2	Jackson ImmunoResearch ref. 705-225-147

Tabla 4: Especificaciones de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunofluorescencias.

4. Análisis morfológico: Tricrómica de Masson

Se cortan los segmentos apicales de los corazones congelados en secciones de 10 µm de grosor y se tiñen un total de 8 secciones por ratón separadas 100 µm, con una tinción tricrómica de Masson (descrita posteriormente) podremos diferenciar entre cardiocitos y la matriz de colágeno. Se captan las imágenes con una lupa Leica a 10 aumentos que permite incluir la sección completa del corazón. El área fibrótica se puede identificar por su color azul claro. Esto nos permite determinar la medida del infarto (superficie), utilizando el programa de análisis ImageJ. Todas las secciones se han examinado ciegamente y los cálculos de los valores expresados se hacen como se describe a continuación.

El área infartada se calcula como el promedio de las superficies ricas en colágeno de las diferentes secciones respecto al promedio de la superficie total de la pared del ventrículo izquierdo. Los valores se expresan en porcentaje.

4.1 Tinción Tricrómica de Masson

La tricrómica de Masson se utiliza con el objetivo de diferenciar las células del tejido conectivo que las rodea. En nuestro caso nos permite visualizar la cicatriz generada después del infarto de miocardio y diferenciarla del tejido viable restante.

Soluciones necesarias:

- Ácido fosfomolibdico:

- 1 g de ácido fosfomolibdico en 100 ml H₂O

- Azul de anilina:

- Ácido acético 2,5% (2,5 ml en 100 ml H₂O)
- Solución de azul de anilina saturada

- Agua acética:

- 1 ml de ácido acético
- 99 ml de H₂O

- Fucsina de Ponceau:

· Solución A:

- 1 g de Ponceau Solidina
- 100 ml H₂O acética 0,5%

· Solución B:

- 1 g de Fucsina ácida
- 100 ml H₂O acética 0,5%

Mezclar 2 partes de la Solución A + 1 parte de la Solución B

Protocolo:

- Preparar los diferentes colorantes.
- Desparafinar i rehidratar con un protocolo estándar.

- Lavar la muestra con agua corriente durante 5 min.
- Teñir con hematoxilina durante 5 min.
- Lavar con agua corriente.
- Lavar con agua acética.
- Lavar con agua corriente.
- Teñir con Fucsina de Ponceau durante 5 min.
- Lavar con agua corriente durante aprox. 1 min.
- Lavar con agua acética durante aprox. 1 min.
- Incubar en ácido fosfomolibdico.
- Lavar con agua acética durante 1 min.
- Teñir con azul de anilina durante 5 min.
- Lavar con agua corriente.
- Lavar con agua acética.
- Lavar con agua corriente.
- Deshidratar:
 - *5 min en etanol 70°
 - *2 x 5 min en etanol 96°
 - *2 x 5 min en etanol 100°
 - *20 min xileno
- Montar.

Resultados esperados:

- Citoplasma, queratina, fibras musculares y eritrocitos-Rojo
- Núcleos-Azul oscuro
- Colágeno- Azul

5. Densidad vascular: Tinción con Lectina GSLIB4

La lectina I-isolectina B4 de la *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* (GSL I o GSL I-B4) es un buen marcador para identificar las células de linaje endotelial.^{180,}

¹⁸¹ Las secciones de corazón de ratón se tiñen con lectina GSLIB4 siguiendo el protocolo que se describe más abajo. Como sistema de detección se utiliza el anticuerpo Alexa 647 conjugado a estreptavidina (Invitrogen). Se determina el

área de marcaje de lectina y en proporción a la superficie total analizada del tejido. Se obtiene así el % del área vascular. Se captan imágenes de 20 campos seleccionados aleatoriamente (10 de la zona del margen del infarto y 10 de zonas distales) en 2 secciones por cada animal, en un total de 32 animales (8 controles MI, 8 controles MI fibrina, 8 MI+hAMSC y 8 MI+FP-MS). Las imágenes se captan con el microscopio confocal Leica SP5 y tanto las superficies de tejido como de marcaje con lectina se miden en cada campo con el programa de análisis de imagen ImageJ. Los valores finales se obtuvieron a partir de la media de las secciones para no sobredimensionar la medida de la muestra.

- Procedimiento:

Soluciones necesarias:

-TBS 10x pH 7,4:

·87,66g NaCl

·60,57g Tris

·1000 ml H₂O

Ajustar a pH 7,4 y diluir a 1X

- Secar las secciones con la ayuda de un ventilador durante 30 min.
- Lavar las secciones 2 X 5 min en TBS.
- Lavar las secciones 3 X 10 min en TBS + 0,5% Tritón-X100 (0,1% TBS-T).
- Incubación con la lectina: Diluir la GSL I isolectina B4 biotinilada (Vector, ref. B-1205) en 1% BSA en 0,1% TBS-T. Incubar o/n a 4°C en una cámara húmeda. Dilución 1:25.
- Atemperar durante 1h a temperatura ambiente.
- Lavar las secciones 3 X 5 min en 0,5% TBS-T.
- Incubar las secciones en estreptavidina conjugada con Alexa 647 (Invitrogen, ref. S32357) en TBS durante 1h a temperatura ambiente en una cámara húmeda protegida de la luz. Dilución 1:500 (4 µg/ml).
- Proteger las secciones de la luz hasta el final del protocolo.
- Lavar las secciones 3 X 5 min en TBS.
- Incubar con Hoechst (1 µg/ml) durante 15 min en una cámara húmeda.

- Montar en medio Fluoromount™ (Sigma).
- Observación i captación de imágenes en el microscopio confocal de fluorescencia Leica SP5 .

RESULTADOS

I. FP-MSC: CELULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE ALTA CAPACIDAD PROLIFERATIVA

Las células mesenquimales estromales de tejido adiposo (hAMSC) son excelentes candidatas para la terapia celular. Sin embargo, la producción de gran cantidad de células (del orden de 10^9) necesarias en los procedimientos de terapia celular en animales grandes, requiere también largos períodos de cultivo y un peligro asociado de daño genético.

Es esta tesis, se ha caracterizado un tipo celular derivado de MSC de tejido adiposo humano que por tener una elevada capacidad proliferativa, pueden ser de utilidad en diversas estrategias de terapia celular.

1. Comparación de la capacidad proliferativa y senescencia de las hAMSC y FP-MSC

Durante estudios de la capacidad de expansión de las células mesenquimales de tejido adiposo humano, se cultivaron hAMSC de diversos pacientes en el medio estándar, DMEM y EGM-2 (Endotelial Growth Medium), durante períodos largos de tiempo (Figura 20).

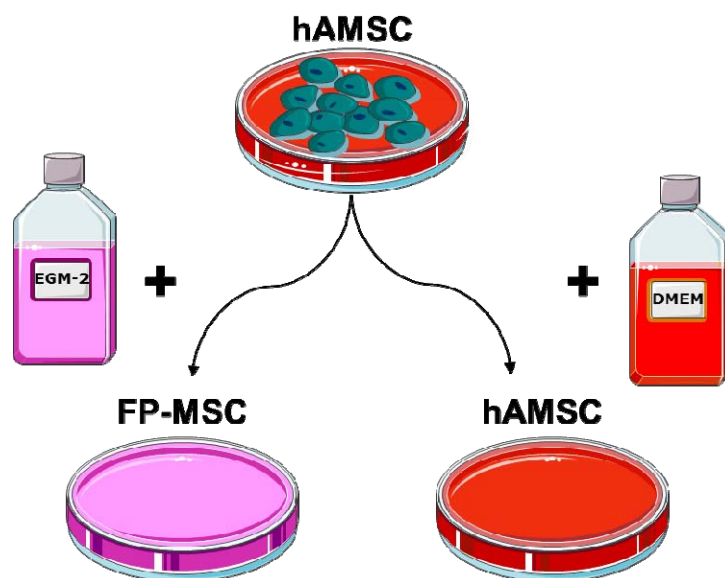


Figura 20: Esquema de la obtención de las FP-MSC.

Se midió el tiempo de duplicación, tiempo necesario para que una población duplique el número de sus células, a partir de la curva de crecimiento celular en ambas condiciones. Tal como indica la gráfica de la Figura 21, durante la fase de crecimiento exponencial, las células en EGM-2 presentan un tiempo de duplicación medio significativamente más corto, 1,5 días, frente a los 5,1 días que se precisan en DMEM. Esto se puede traducir en una velocidad de proliferación 4,4 veces mayor en EGM-2 que en DMEM. Como resultado, para obtener un total de 10^{10} células en cada uno de los medios (intersección con la línea roja), se requieren periodos de cultivo medio de 16,9 y 75,0 días, respectivamente.

Aunque las hAMSC crecen más rápido en EGM-2, su capacidad de expansión sigue siendo finita y no está modificada. Después de una fase de crecimiento rápido parece producirse una fase de estacionamiento con crecimiento cero. El cálculo del número de ciclos transcurridos para llegar a esta fase indica que en los dos medios parece no solamente haber un número máximo de ciclos posibles, sino también que la capacidad de duplicación poblacional máxima (PD) es similar, 19,5 y 24,4 ciclos respectivamente en ambas condiciones de cultivo. Tinciones de β -Galactosidasa en diferentes fases del proceso de expansión nos muestran que tanto las células crecidas en EGM-2 como en

DMEM, después de un número determinado de ciclos, entran en fase de senescencia, después de la cual, cesa la proliferación celular.

El cambio a fenotipo proliferador se produjo consistentemente en las hAMSC derivadas de todos los pacientes. A partir de aquí denominaremos las hAMSC crecidas en EGM-2 como FP-MSC (“fast-proliferating hAMSC”).

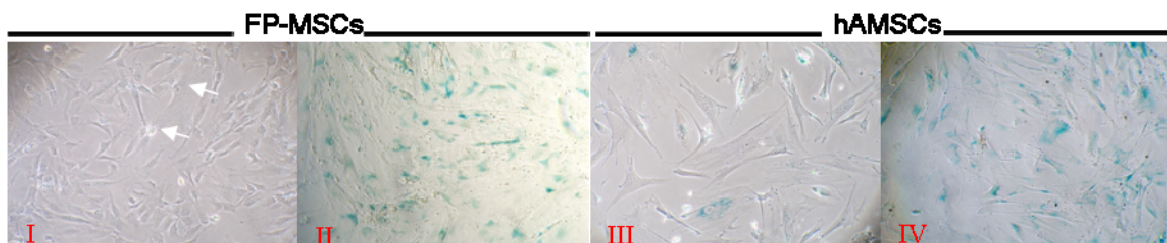
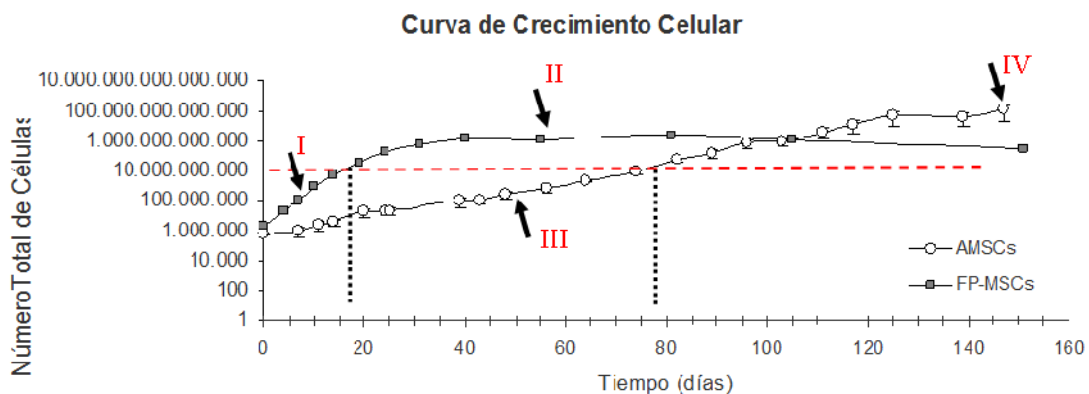


Figura 21: Capacidad proliferativa de las hAMSC en los diferentes medios. Panel superior, curva de crecimiento de las hAMSC crecidas en DMEM (AMSC) y en EGM-2 (FP-MSC). La línea roja indica 10^{10} células. Panel inferior, expresión de β -Galactosidasa detectada mediante un ensayo colorimétrico, indicando la entrada en fase senescente. Los números romanos indican en qué fase de la curva de crecimiento se analizaron las muestras.

2. Morfología y capacidad de diferenciación

Mientras que las células mesenquimales en DMEM presentan una morfología fibroblastoide, en forma de huso característica. El cambio de medio a EGM-2, provoca leves cambios en la morfología de las hAMSC, que aunque siguen

RESULTADOS

manteniendo la forma fibroblastoide y fusiforme, son ahora más alargadas y de menor volumen, tal como se puede apreciar en las Figura 22, A1 y B1.

La capacidad de diferenciación a otros tipos celulares es una propiedad intrínseca que define a las MSC. En este trabajo hemos comprobado que las FP-MSC conservan su capacidad multipotente tanto a pase temprano (PD medio ~ 6) como a pase tardío (PD medio ~ 16). Ambos tipos celulares pueden ser inducidos a diferenciarse, bajo los estímulos adecuados, a linajes tales como el osteogénico o el adipogénico, (Figura 22 A2 y 3, y B2 y 3). El colorante rojo de alizarina S, nos permite detectar los depósitos de calcio característicos de la diferenciación a osteocito; el pigmento *Oil red O* tiñe las vacuolas lipídicas en el interior de las células conforme se han diferenciado a adipocitos.

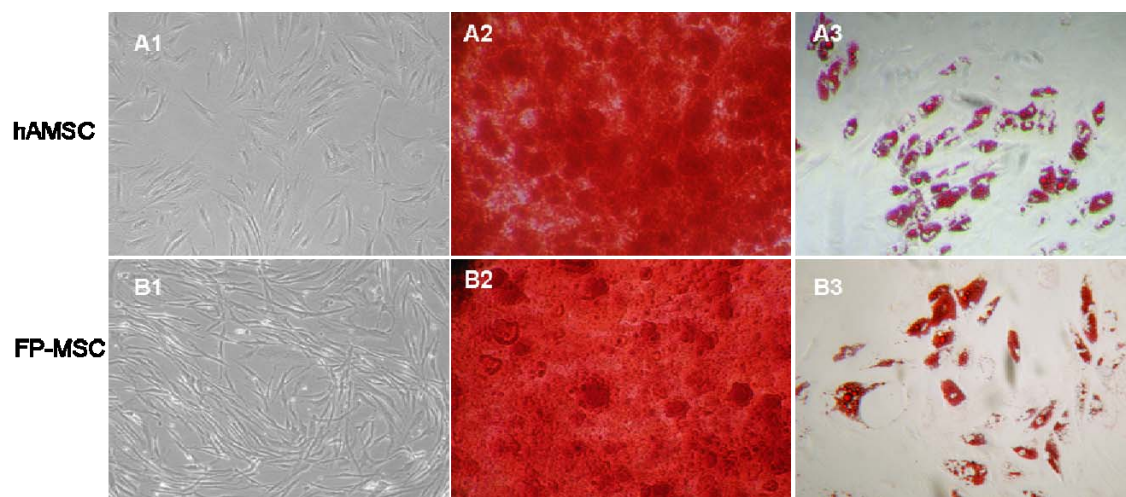


Figura 22: Capacidad de diferenciación de las hAMSC y las FP-MSC. En la primera columna se muestra la morfología celular en ambas condiciones de cultivo. Segunda y tercera columna, imágenes de cultivos diferenciados al linaje osteogénico y adipogénico detectados mediante tinción con alizarina S y *Oil red O*, respectivamente.

3. Marcadores de superficie

Además de su capacidad de diferenciación y adhesión a plástico, las MSC expresan un perfil de marcadores de superficie característico. Por ello, se comparó para los 3 pacientes la expresión de diferentes marcadores de superficie, en hAMSC crecidas en DMEM (PD medio ~ 10) y su

correspondiente FP-MSC (crecidas en EGM-2) de pase temprano (PD medio ~ 9) y de pase tardío (PD medio ~ 18); podremos analizar si el perfil inmunofenotípico se ve afectado por el cambio de medio y/o el tiempo de cultivo en estas nuevas condiciones.

Según la definición de las MSC, más del 95% de la población debe expresar los antígenos específicos de superficie CD105, CD73 y CD90, adicionalmente, no deben expresar (menos del 2% positivas) otros marcadores como por ejemplo, el CD34. En nuestro caso, las hAMSC crecidas en DMEM cumplen estos requisitos, sin embargo las FP-MSC presentan dichos marcadores pero en una proporción significativamente inferior ($p < 0.05$, $\dagger < 0.01$); la ausencia de CD34 se da en ambos tipos celulares (Figura 23).

A parte de los marcadores mencionados anteriormente, las mesenquimales son positivas para otros marcadores aunque, ninguno de ellos específico para hAMSC (Apéndice I). Se estudiaron marcadores generales como CD13, CD29, y CD44, y otros marcadores que diferencian las mesenquimales procedentes de tejido adiposo y médula ósea, como por ejemplo, el CD49d y CD54 para los que las primeras son positivas y negativas las segundas y el CD106, para el que son negativas las hAMSC y positivas las MSC de médula ósea. Salvo el CD106, que no se encontró en las hAMSC, todos estos marcadores se encontraron tanto en hAMSC como en FP-MSC. Sin embargo, el nivel de expresión de cada uno de ellos si fue característico del tipo celular (Figura 22). Muchos de los marcadores que hemos empleado para analizar las células mesenquimales, se encuentran también expresados en células endoteliales (CD29, CD34, CD49d, CD54 CD105 y CD106), y dado que el medio EGM-2 es un medio inductor de la diferenciación endotelial, es lógico pensar que la expresión de dichas moléculas de superficie se vea modificada por el cambio de medio. De entre estas últimas moléculas, el porcentaje de células positivas para CD106 y CD49d fue superior en las FP-MSC mientras que disminuyó para CD54 y CD105 en las mismas células, relativo a las hAMSC.

En lo que se refiere a los marcadores característicos de las células endoteliales CD31, VEGFR2, y CD144, ninguno de ellos se encontró representado en

RESULTADOS

ninguno de los tipos mesenquimales (FP-MSC o hAMSC), excepto por una ligera traza (<10%) de células positivas para el VEGFR2 en las hAMSC (Tabla 5).

También se analizó la expresión del CD133 y c-Kit, marcadores de células madres. Ambos marcadores se encontraron ausentes en hAMSC, y muy poco expresados en FP-MSC. En el caso concreto del CD133, aunque baja, la proporción positiva fue significativamente diferente y superior en las FP-MSC de fase temprano que en las hAMSC.

A rasgos generales, en lo que se refiere a presencia y/o ausencia de los marcadores, el perfil de expresión, es bastante similar en ambos tipos celulares. Sin embargo, se observan diferencias significativas ($p < 0.05$, * $\dagger < 0.01$) entre hAMSC y FP-MSC en la proporción de células que expresan algunos de los marcadores

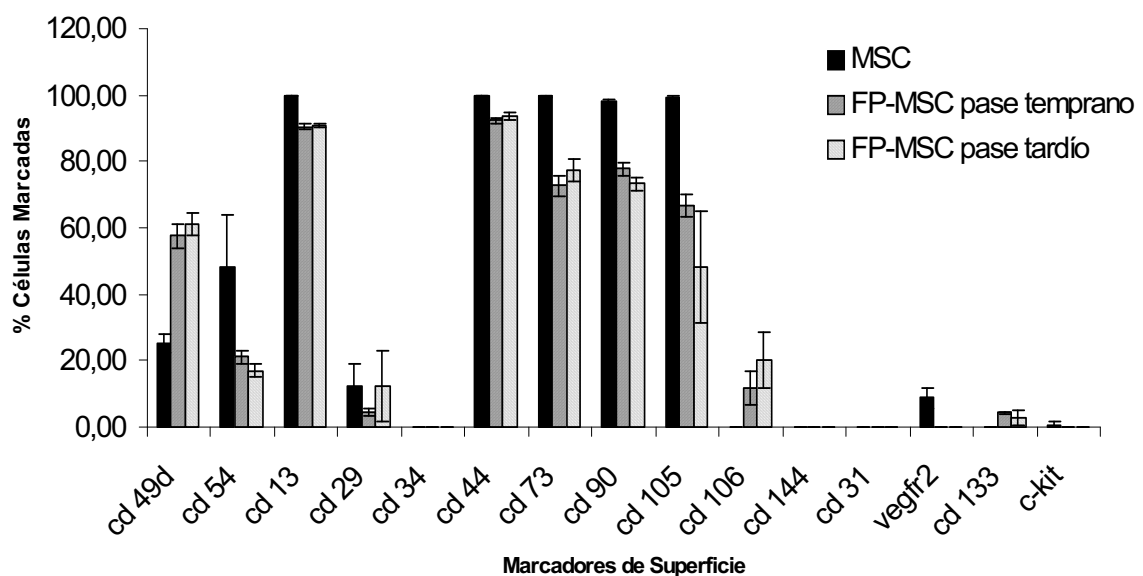


Figura 23: Marcadores de superficie. Las barras muestran la proporción de células que expresan el marcador de superficie indicado en hAMSC y FP-MSC, de fase temprano y tardío (t-Student, comparado con hAMSC para cada marcador * $p < 0.05$; $\dagger p < 0.01$).

			FP-MSC		
			hAMSC	Pase Temprano	Pase Tardío
Marcadores de Mesenquimales	Marcadores de Tejido Adiposo	cd 49d	25,4 ± 2,9	57,6 ± 3,6	61,2 ± 3,5
		cd 54	48,2 ± 15,5	21,3 ± 2,0	17,0 ± 1,9
	Marcadores Generales	cd 13	99,9 ± 0,1	90,5 ± 0,8	90,9 ± 0,6
		cd 29	12,5 ± 6,5	4,6 ± 1,0	12,2 ± 10,6
		cd 34	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
		cd 44	99,9 ± 0,0	92,5 ± 0,8	93,6 ± 1,1
		cd 90	98,1 ± 0,6	77,7 ± 1,9	73,2 ± 2,0
		cd 73	99,6 ± 0,1	72,8 ± 3,1	77,5 ± 3,3
		cd 105	99,3 ± 0,3	66,7 ± 3,3	48,2 ± 17,0
		cd 106	0,0 ± 0,0	11,9 ± 5,1	20,2 ± 8,6
Marcadores Endoteliales	cd 144	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
	cd 31	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
	vegfr2	8,8 ± 3,2	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
Marcadores de Célula Madre	cd 133	0,0 ± 0,0	4,2 ± 0,4	2,7 ± 2,3	
	c-kit	0,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	

Tabla 5: Fracción de células positivas para los marcadores de superficie indicados. Los datos corresponden a la media de los valores obtenidos de los tres pacientes estudiados ± el error típico.

4. Tumorigenicidad

Las FP-MSC presentan alta capacidad proliferativa. La necesidad de producir gran cantidad de células para terapia celular requiere de su expansión *in vitro*. El crecimiento celular *in vitro* puede asociarse con diversos cambios, por ello es necesario evaluar la capacidad tumorigénica de las células que van a ser empleadas en terapia celular.

La estabilidad genómica en las MSC es un tema que ha despertado controversia. Mientras que diferentes grupos de investigación han encontrado indicios de inestabilidad y estabilidad genómica en MSC humanas, otros se han concentrado en el estudio de la relación entre los posibles cambios genéticos y sus implicaciones en la transformación celular

Con el fin de conocer si se produce algún tipo de anomalías genómica asociada al cambio de fenotipo o durante el cultivo, en este trabajo se realizaron análisis de estabilidad genómica mediante el procedimiento de

Hibridación Comparativa de Genoma (CGH). El procedimiento CGH nos permite detectar pérdidas, ganancias y amplificaciones del número de copias de ADN, de un tamaño mínimo de 5-10 Mb, a nivel cromosómico. Para ello, se analizaron tanto las hAMSC originales (PD medio ~ 10) como las FP-MSC de pase temprano (PD medio ~ 9) y tardío (PD medio ~ 18). Nuestro análisis mostró que en ningún caso hubo ganancias o pérdidas genómicas significativas con respecto a las células originales. Cabe apuntar, que una aparente trisomía del cromosoma 21 detectada en una de las FP-MSC demostró, después de un análisis más profundo, estar ya presente en el paciente de origen. A parte de esto, tanto los cariotipos de las células originales como los de las FP-MSC derivadas fueron normales (Figura **24**).

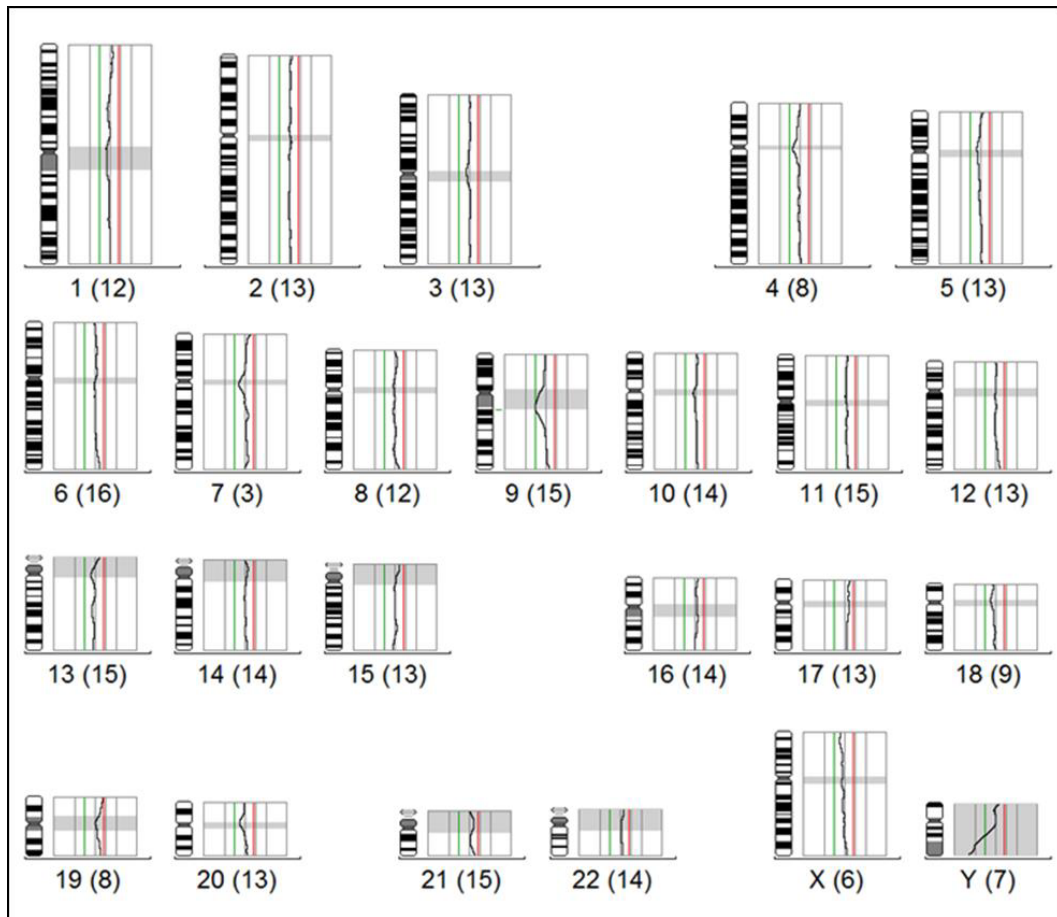


Figura 24: Perfil CGH representativo de una de las muestras FP-MSC de pase tardío. Las áreas sombreadas correspondientes a los centrómeros y a la heterocromatina constitutiva, no son consideradas. Las líneas verticales representan valores del ratio de fluorescencia, así, las líneas verde y roja corresponden a los valores 1,25 y 0,75 respectivamente. Valores de CGH comprendidos entre 1,25 y 0,75 indican que no hay ganancias o pérdidas significativas en relación al ADN control. La relación (línea negra) entre el ADN de la muestra y el del ADN control muestra la ausencia de ganancias o pérdidas de ADN en los cromosomas. Los números que corresponden a cada diagrama indican el número de cromosomas y entre paréntesis, el número de cromosomas analizado, respectivamente.

Debido a que el procedimiento CGH solo revela anomalía genómicas relativamente grandes, se realizaron pruebas complementarias, mediante xenotransplantes en animales inmunosuprimidos, para determinar funcionalmente la capacidad carcinogénica de las FP-MSC. Para ello, hAMSC, FP-MSC (pase temprano) y FP-MSC (pase tardío) de tres pacientes diferentes fueron transducidas con un vector lentivírico portador del gen trazador *Photinus*

RESULTADOS

p. luciferase regulado por el promotor de citomegalovirus (CMV) e implantadas intramuscularmente en los muslos de ratones SCID. Este tipo de trazador nos permite hacer un seguimiento *in vivo* del comportamiento de estas células sin la necesidad de sacrificar los ratones. Se monitorizó comparativamente, mediante imágenes de bioluminiscencia no invasivas, las células hAMSC y FP-MSC de pase temprano y tardío para los 3 pacientes, durante un periodo de 160 días. En este tiempo, aunque solo una fracción de las células implantadas fueron capaces de sobrevivir después del día 25 post-inoculación, no hubo indicación de proliferación celular excesiva ni de generación de tumor (Figura 25).

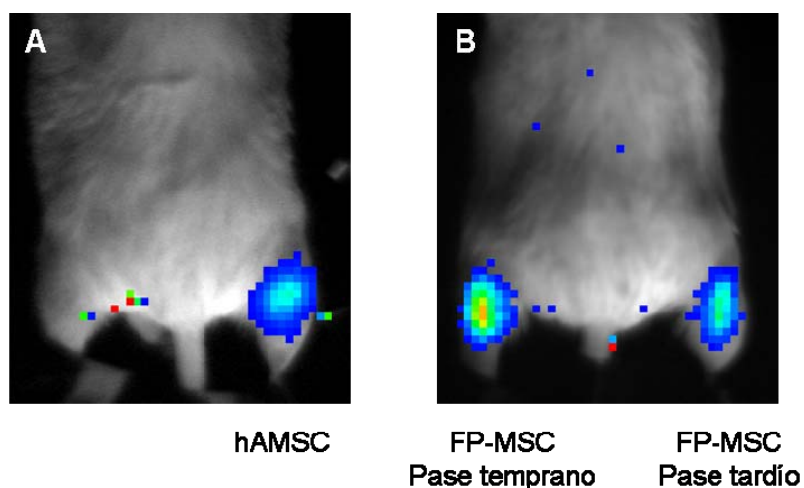
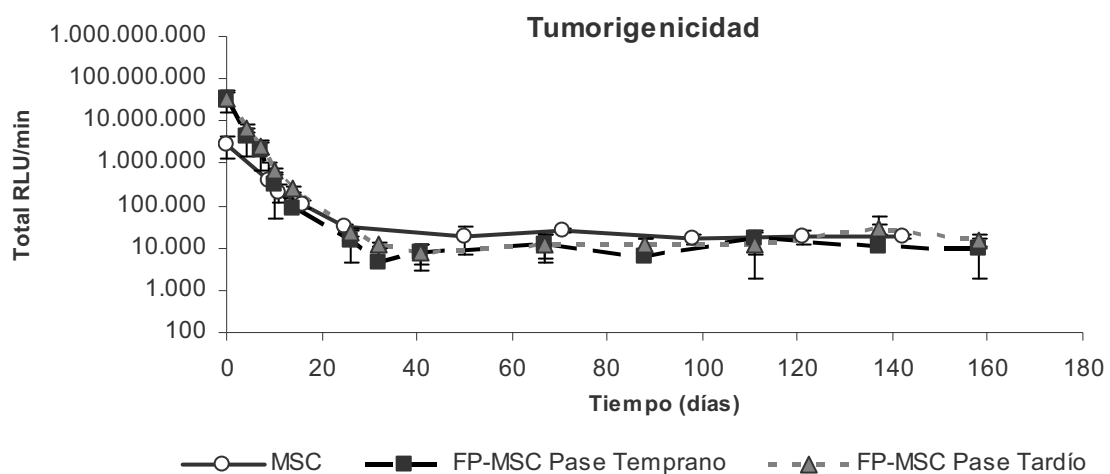


Figura 25: Panel superior, la gráfica muestra el número de fotones registrado en las imágenes producidas por las células implantadas en animales vivos. No se observa crecimiento anormal. Panel inferior, imagen representativa de la última adquisición (160 días) previa al sacrificio de los animales. (A) muslo derecho hAMSC marcadas. (B) muslo izquierdo FP-MSC pase temprano; muslo derecho, FP-MSC pase tardío.

5. Perfil de expresión génica

Para continuar con la caracterización de las FP-MSK, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes con respecto a las hAMSK de la cuales proceden. Con este análisis se pretende encontrar un patrón de genes relacionados con el cambio de fenotipo que nos permitiría caracterizar este tipo celular.

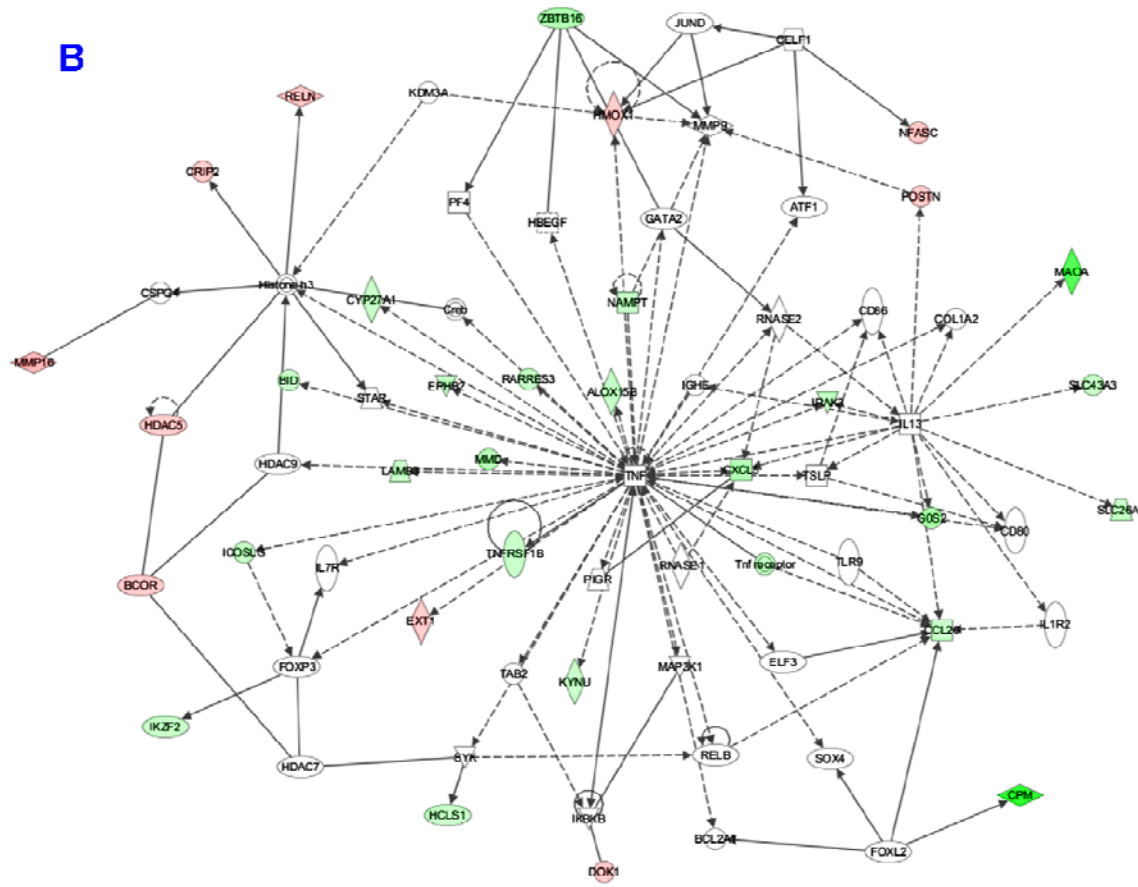
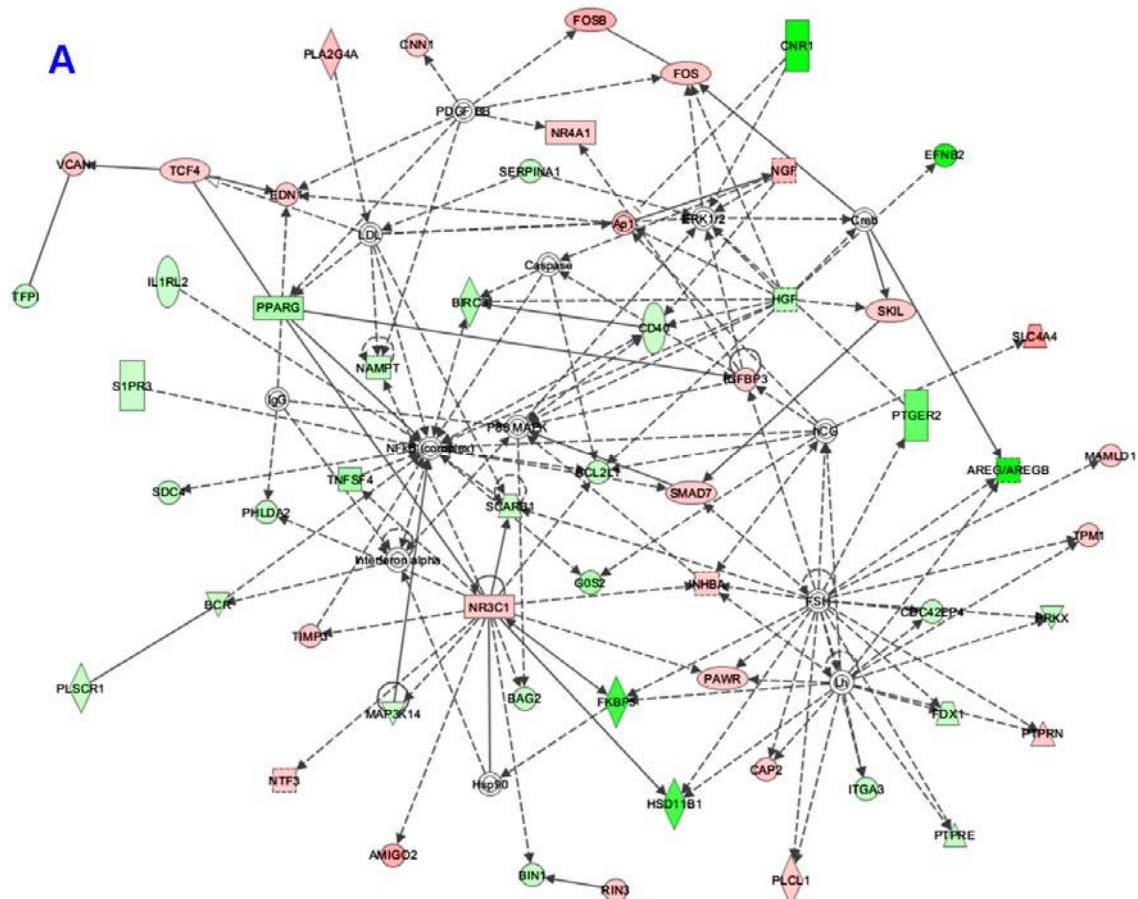
Para ello se empleó el chip Human Gene 1.0 ST de Affymetrix. Los resultados fueron analizados con el programa Partek Genomics Suite (Partek Inc.), que generó una lista de genes que, de forma significativa, se expresaban diferencialmente entre las dos condiciones estudiadas (crecimiento en DMEM frente a crecimiento en EGM-2). Los valores-p generados fueron corregidos usando un FDR (*false discovery rate*) obtenido por el método de Benjamini-Hochberg, con un punto de corte del 20%. La lista resultante de genes expresados diferencialmente de forma significativa fue filtrada para incluir solo aquellos que presentasen un cambio en el nivel de expresión, *fold change* (FC) $\geq 1,5$ con respecto a las hAMSK.

Para conocer la implicación en los diferentes sistemas biológicos, los genes de esta última lista se analizaron usando el programa “Ingenuity Pathway Analyse” (IPA). Basado en la base de datos del IPA y un análisis probabilístico, este programa permite crear redes de interacciones en las cuales, se muestran las moléculas asociadas por un proceso/función determinado. A las redes que se crean, se asigna una puntuación basada en el cálculo probabilístico, que valora la probabilidad de que las moléculas de la lista formen parte de una red, por un fenómeno de azar. Matemáticamente, el resultado de la puntuación es simplemente el módulo del exponente negativo resultante de la prueba de Fisher, p. ej., una puntuación de 3, significa que es 1 entre 1000 la posibilidad de que estas moléculas se encuentren en una red determinada por casualidad.

Las redes biológicas encontradas por el IPA con mayor puntuación fueron: “Proliferación y Crecimiento Celular, Morfología Celular, y Muerte Celular” (Network 1: puntuación 82) y “Movimiento Celular, Señalización e Interacción Célula-a-Célula, Desarrollo Celular” (Network 2: puntuación 34). En ambas

RESULTADOS

redes, hubo una predominante regulación al alza en las FP-MSK, como se puede observar por el número de moléculas representadas en color verde; la intensidad del color es directamente proporcional al nivel de expresión (Figura 26). En la Tabla 6, se muestran los de FC de los genes inducidos en FP-MSK recogidos en estas dos redes (estos valores negativos se corresponden con las moléculas representadas en verde de diferentes intensidades en las diferentes redes).



RESULTADOS

Figura 26: Redes biológicas de mayor puntuación encontradas por IPA. “Proliferación y Crecimiento Celular, Morfología Celular, y Muerte Celular” (Network 1: puntuación 82) (A); “Movimiento Celular, Señalización e Interacción Célula-a-Célula, Desarrollo Celular” (Network 2: puntuación 34) (B). Aquellas moléculas con una expresión diferencial entre FP-MSC Y hAMSC, se muestran coloreadas; en verde las de mayor nivel de expresión en FP-MSC y en rojo las de menor. Las moléculas sin color son aquellas que no pertenecen a nuestra lista aunque actúan como conectores entre las moléculas de nuestra lista. La intensidad del color es directamente proporcional al cambio de nivel de expresión o FC.

Symbol	Entrez Gene Name	Fold Change	Location	Type(s)	
Network 1	CNR1	-31,627	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	
	AREG/AREGB	-31,481	Extracellular Space	growth factor	
	EFNB2	-26,049	Plasma Membrane	other	
	FKBP5	-19,747	Nucleus	enzyme	
	HSD11B1	-19,149	Cytoplasm	enzyme	
	PTGER2	-15,357	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	
	TNFSF4	-7,302	Extracellular Space	cytokine	
	PPARG	-7,209	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	
	BIRC3	-6,595	Cytoplasm	enzyme	
	HGF	-5,638	Extracellular Space	growth factor	
	TFPI	-4,329	Extracellular Space	other	
	SERPINA1	-2,826	Extracellular Space	other	
	IL1RL2	-2,651	Plasma Membrane	transmembrane receptor	
	CD40	-2,579	Plasma Membrane	transmembrane receptor	
	PLSCR1	-2,288	Plasma Membrane	enzyme	
	SCARB1	-2,088	Plasma Membrane	transporter	
	S1PR3	-1,999	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	
	SDC4	-1,973	Plasma Membrane	other	
	MAP3K14	-1,964	Cytoplasm	kinase	
	FDX1	-1,953	Cytoplasm	transporter	
	BCL2L1	-1,858	Cytoplasm	other	
	BIN1	-1,846	Nucleus	other	
	PHLDA2	-1,814	Cytoplasm	other	
	BCR	-1,636	Cytoplasm	kinase	
	PTPRE	-1,620	Plasma Membrane	phosphatase	
	PRKX	-1,570	Cytoplasm	kinase	
	CDC42EP4	-1,523	Cytoplasm	other	
	BAG2	-1,507	Cytoplasm	other	
	Network 2	CPM	-21,249	Plasma Membrane	peptidase
		MAOA	-16,804	Cytoplasm	enzyme
		ZBTB16	-6,652	Nucleus	transcription regulator
		CXCL5	-6,570	Extracellular Space	cytokine
		MMD	-6,415	Plasma Membrane	other
ALOX15B		-4,850	Cytoplasm	enzyme	
CCL20		-3,985	Extracellular Space	cytokine	
RARRES3		-3,517	Cytoplasm	other	
IRAK3		-3,260	Cytoplasm	kinase	
SLC43A3		-3,120	Extracellular Space	other	
LAMB3		-2,843	Extracellular Space	transporter	
SLC26A6		-2,799	Cytoplasm	transporter	
IKZF2		-2,798	Nucleus	transcription regulator	
KYNU		-2,570	Cytoplasm	enzyme	
HCLS1		-2,051	Nucleus	transcription regulator	
TNFRSF1B		-1,897	Plasma Membrane	transmembrane receptor	
ICOSLG		-1,817	Plasma Membrane	other	
CYP27A1		-1,772	Cytoplasm	enzyme	
BID	-1,658	Cytoplasm	other		

Tabla 6: Datos de los valores de FC para las moléculas marcadas en verde en las dos redes de mayor puntuación. En amarillo, se resaltan aquellas moléculas seleccionadas para validación por RT-PCR.

El programa IPA, nos facilita también información relacionada con funciones biológicas o enfermedades. Se han encontrado más de 70 funciones modificadas ($p < 0.05$) en nuestra lista de genes. En la Figura 27, se muestra un

fragmento de la gráfica original que recoge las funciones biológicas o enfermedades modificadas según la base de datos del IPA. Solo mostramos las 10 primeras funciones modificadas, que corresponden con las de mayor valor de p; la altura de la barra equivale al p-valor asignado a dicha función.

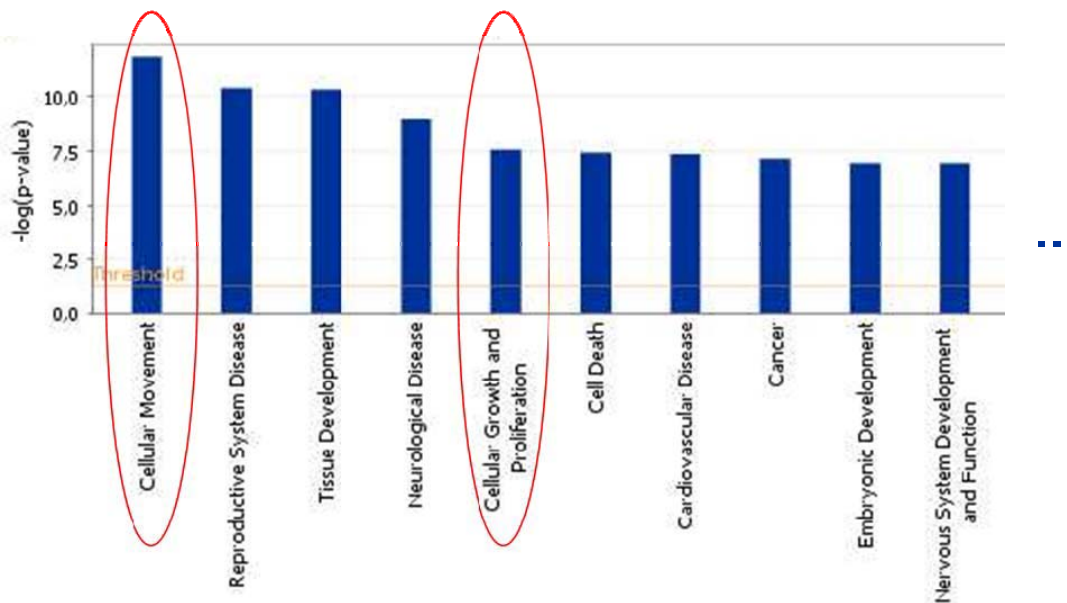


Figura 27: Funciones biológicas o enfermedades asociadas a cambios en los genes analizados según la base de datos del IPA. La gráfica recoge las 10 funciones con mayor valor p de nuestra lista de genes, la altura de la barra representa el valor p asignado. Las funciones resaltadas con la elipse roja son aquellas relacionadas con este trabajo.

Basándonos en los resultados de las dos redes de mayor puntuación, se seleccionó una lista de 12 genes, de acuerdo al nivel de expresión (mayor inducción en FP-MSC) y a las funciones biológicas asignadas por el IPA (“Proliferación y Crecimiento Celular” p-valor <0,05 y/o “Movimiento Celular” p-valor <0,05) (Tabla 7).

Estos 12 genes fueron validados por RT-PCR en los dos tipos celulares (FP-MSC y hAMSC) para todos los pacientes, y además, en una pareja extra de FP-MSC y hAMSC de un paciente nuevo. Los resultados obtenidos de las RT-PCR confirman los FC obtenidos por los microarrays, entre las hAMSC y las FP-MSC para todos los genes seleccionados. Los datos quedan resumidos en la Tabla 7. De acuerdo a la prueba t para datos pareados, la mayoría de los

RESULTADOS

genes presentan un valor medio de FC significativo en las FP-MSC con respecto a las hAMSC ($\dagger p<0.1$; $*p<0.05$), con lo cual podemos afirmar que estos genes han aumentado su expresión en las FP-MSC.

Con esto, se puede definir un perfil de expresión de genes concretos, que caracterizan el fenotipo de las FP-MSC en medio EGM-2.

Genes	Red Asignada	Función Biológica Asignada	Paciente L060605	Paciente L100605	Paciente L110605	Paciente L020609	Promedio FC (Prueba-T pareada)
ALOX15B	2	migración celular, proliferación celular	2.156,4	1.683,7	1.269,1	566,8	1.703,0 *
CCL20	2	migración celular, proliferación celular	761,2	582,1	46,7	38,4	463,4 n.s.
CNR1	1	migración celular, proliferación celular	375,2	38,8	334,5	168,3	249,5 *
FKBP5	1	proliferación celular	82,6	69,9	54,9	14,7	69,1 *
HGF	1	migración celular, proliferación celular	186,8	19,7	20,8	20,0	75,7 *
PTGER2	1	migración celular, proliferación celular	105,8	798,2	101,2	807,7	335,1 *
ZBTB16	2	migración celular, proliferación celular	8.991,2	290,6	1.175,7	276,3	3.485,8 *
AREG/ AREGB	1	migración celular, proliferación celular	86,4	180,3	715,1	58,6	327,2 †
CPM	2	proliferación celular	176,2	121,3	147,3	37,8	148,3 *
EFNB2	1	migración celular, proliferación celular	70,7	73,4	966,3	24,9	370,1 *
HSD11B1	1	proliferación celular	857,6	260,8	917,4	241,8	678,6 †
MAOA	2	migración celular	631,8	192,1	675,9	62,3	499,9 *

Tabla 7: Resumen del análisis IPA y validación por RT-PCR. Columna “Red Asignada”: red a la que pertenece cada gen según el programa IPA; columna “Función Biológica Asignada”: funciones biológicas asignadas según IPA y que coinciden con nuestro criterio. Valores de FC de las FP-MSC con respecto a las hAMSC para cada paciente, en gris los valores de la muestra nueva. La media del grupo de los pacientes para cada gen fue analizada mediante la prueba-t para datos pareados ($p<0,05$; $\dagger p<0,1$).

6. Origen del fenotipo FP-MSC: SELECCIÓN O INDUCCIÓN

Los resultados anteriores muestran que el fenotipo FP-MSC es un fenómeno reproducible característico de las hAMSC. Sin embargo, la población mesenquimal es heterogénea por definición, y para determinar si este cambio fenotípico se reproduce a nivel celular se estudió mediante clonaje celular, el efecto del EGM-2 sobre clones celulares, cuyo fondo genético es idéntico.

Sin embargo, cabe especular que las FP-MSC o son una subpoblación preexistente entre las definidas como células mesenquimales que se ha

seleccionado por el cambio de medio de cultivo o, por el contrario, el FP-MSC puede ser un fenotipo inducido en las hAMSC por el cambio de dicho medio.

Para determinar el efecto del EGM-2 a nivel celular, se llevó a cabo la siguiente estrategia de clonaje celular. Se tomaron células hAMSC de uno de los pacientes (L020609) y mediante clonaje por dilución límite se sembró una célula por pocillo, en 5 placas de 96-pocillos en DMEM (Figura 28). De éstas, aproximadamente el 6,7% de los pocillos (32) generaron colonias procedentes de una única célula con fenotipo mesenquimal. Estas colonias fueron divididas en dos, una mitad se mantuvo en medio DMEM y la otra se pasó a EGM-2 (condiciones de cultivo de las FP-MSC). El 30% de estas colonias pudieron ser expandidas por más de 15 PD en ambas condiciones. El tiempo de duplicación medio de los diferentes clones en los dos medios, fue significativamente diferente: 1.79 días en EGM-2 frente a los 3.74 días en DMEM ($p < 1E-6$), tal como se había estimado anteriormente.

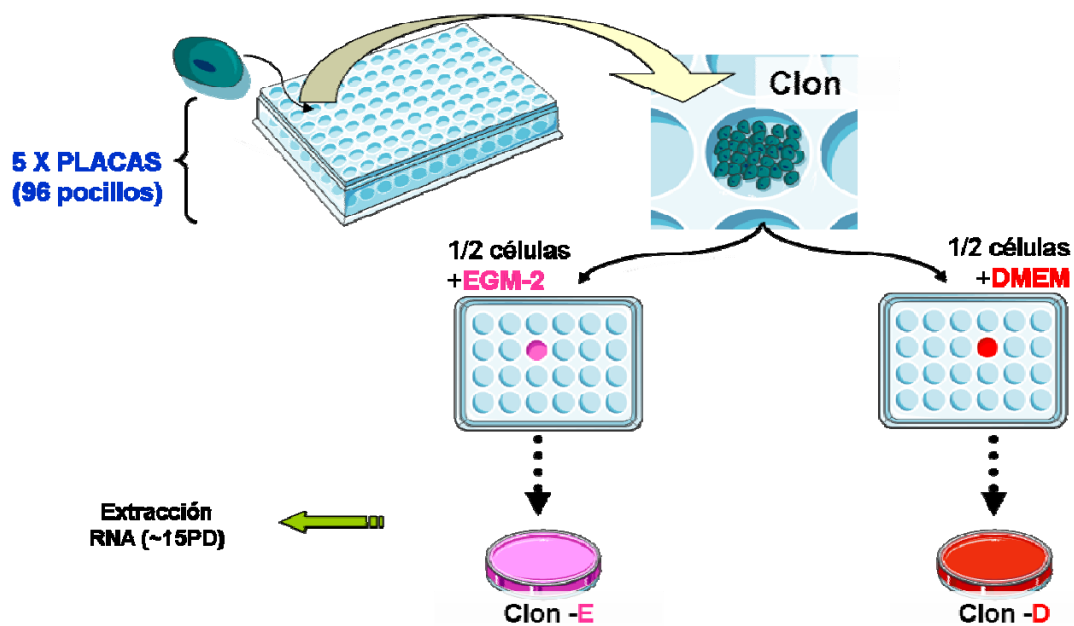


Figura 28: Esquema de la estrategia de clonaje celular para estudiar el efecto del cultivo en EGM-2.

Seleccionamos 3 parejas de clones representativos en cuanto al número máximo de células obtenidas se refiere (mayor crecimiento en DMEM, mayor crecimiento en EGM-2 y un crecimiento equivalente en ambos medios) (Tabla

RESULTADOS

8). A cada clon se le asignó la inicial del medio en el que ha sido crecido para poder diferenciarlas, “D” crecidas en DMEM y “E” crecidas en EGM-2.

	Clon M05		Clon M17		Clon M27	
	DMEM (M05-D)	EGM-2 (M05-E)	DMEM (M017-D)	EGM-2 (M017-E)	DMEM (M027-D)	EGM-2 (M027-E)
Número máximo de células	800.000	35.000	63.000	405.000	1.730.000	3.830.000
Tiempo (días)	82	46	85	43	78	43
PD (máxima)	19,61	15,10	15,94	18,63	20,72	21,87
Tiempo de Duplicación	3,47	2,12	4,45	1,56	3,09	1,33

Tabla 8: Propiedades proliferativas de los diferentes clones seleccionados en las condiciones de cultivo DMEM y EGM-2. Cada clon tiene la inicial del medio en el que se ha cultivado, “D”, DMEM; “E”, EGM-2. La fila “Tiempo” indica los días de cultivo necesarios para llegar al número máximo de células para cada condición. PD, capacidad de duplicación poblacional máxima alcanzada. El Tiempo de Duplicación esta expresado en días.

Se extrajo el RNA total de estas 3 parejas de clones, en DMEM y EGM-2, cuando alcanzaron un número aproximado de unas 30.000 células (~15PD) para cada medio. Este RNA se empleó para realizar RT-PCR para los 12 genes inducidos característicos del fenotipo FP-MSC. El cambio de expresión para cada clon crecido en EGM-2 con respecto a su “hermano” crecido en DMEM se resume en la Tabla 9. En la mayoría de los casos, se observa un cambio de expresión (FC) superior al 1,5 veces para los diferentes genes, independientemente de sus propiedades proliferativas en los diferentes medios. Si aplicamos un T-test comparando el FC de los 3 clones con respecto a los FC de los 4 pacientes, resulta, para todos los genes, una $p > 0.05$, indicando que los FC no se pueden considerar estadísticamente distintos, es decir a nivel transcripcional estos clones no son diferentes de las poblaciones de origen. En otras palabras, tanto si comparamos colonias hermanas con características de expresión diferentes, crecidas en DMEM o EGM-2, cuyo fondo genético es idéntico y la principal variable es el medio de cultivo; como si comparamos poblaciones heterogéneas derivadas de 4 pacientes diferentes, obtenemos un patrón similar en los cambios de expresión de esta lista de genes concreta. Teniendo en cuenta que se partió de colonias únicas con características

proliferativas específicas en cada medio de cultivo y fenotipo MSC, estos resultados apoyan la hipótesis de que el medio EGM-2 es el que induce el fenotipo FP-MSC observado.

Genes	Clon M05	Clon M17	Clon M27	Pomedio FC clones (T-test pacientes vs clones)
ALOX15B	6.165,9	3.029,5	2.176,3	3.790,5 $p>0,05$
CCL20	1.604,4	15,7	5,9	542,0 $p>0,05$
CNR1	0,3	19,0	0,1	6,5 $p>0,05$
FKBP5	4,2	130,0	18,6	51,0 $p>0,05$
HGF	70,6	10,7	1,6	27,6 $p>0,05$
PTGER2	2,7	24,8	9,8	12,4 $p>0,05$
ZBTB16	1.804,8	2.040,0	408,5	1.417,8 $p>0,05$
AREG/ AREGB	464,1	173,0	301,7	313,0 $p>0,05$
CPM	25,6	15,1	27,2	22,6 $p>0,05$
EFNB2	69,9	1.748,5	180,5	666,3 $p>0,05$
HSD11B1	1.312,5	457,9	357,4	709,3 $p>0,05$
MAOA	76,6	2,9	4,4	28,0 $p>0,05$

Tabla 9: Valores de RT-PCR indicativos de los cambios de expresión para cada uno de los clones. Valores de FC del clon crecido en EGM-2 con respecto a DMEM para cada clon y gen. El grupo de los clones fue comparado con el grupo de los pacientes (Tabla 3) mediante una prueba-T para grupos de diferente varianza. Para todos los genes $p>0.05$, no habiendo indicios para considerar ambos grupos estadísticamente diferentes.

7. Reversibilidad del fenotipo FP-MSC

Los resultados anteriores, demuestran que la inducción al fenotipo FP-MSC es un suceso consistente, tanto a nivel de población como a nivel celular.

Para determinar si dicho fenotipo es una propiedad reversible y exclusiva del medio de cultivo, llevamos a cabo un intercambio en las condiciones de cultivo tanto en la población heterogénea como en uno de los clones. Estudiamos el efecto de dicho intercambio en las células procedentes del paciente L020609 y del clon M27.

Los pasos que llevamos a cabo, se representa en la Figura 29. Las hAMSC y FP-MSC del paciente L020609, crecidas en sus correspondientes medio,

fueron divididas en dos: una parte se mantuvo en su medio de partida, y la otra parte se pasó al medio contrario, por ejemplo, para el caso de las FP-MSC, una parte se mantuvo en EGM-2 y la otra parte se pasó a DMEM. Se extrajo ARN total de las células, en la primera y segunda semana después del cambio de las condiciones de cultivo, y se analizaron por RT-PCR los doce genes sobreexpresados, característicos de las FP-MSC (Tabla 10). El cambio de las hAMSC al medio EGM-2 reproduce el proceso de cambio al fenotipo FP-MSC previamente observado, y así, los doce genes estudiados se pasan a sobreexpresar con respecto a las hAMSC mantenidas en su medio original (DMEM), como venimos viendo en los experimentos anteriores. Sin embargo, cuando las FP-MSC se cultivan en medio DMEM, la expresión de estos doce genes cae drásticamente. Se pierde el fenotipo de célula de gran capacidad proliferativa, y los niveles de expresión de los genes estudiados se parecen más a los de las hAMSC crecidas en DMEM que aquellas crecidas en EGM-2.

Podemos afirmar que el fenotipo FP-MSC está íntimamente ligado al medio EGM-2. Dicha propiedad es reversible, es decir, si estas células vuelven a ser cultivadas en el medio estándar de las células mesenquimales (DMEM), las células tornan a la apariencia y velocidad de crecimiento característicos de las hAMSC, y por otro lado, los niveles de expresión para los doce genes estudiados bajan, siendo más similares a las hAMSC que a las FP-MSC.

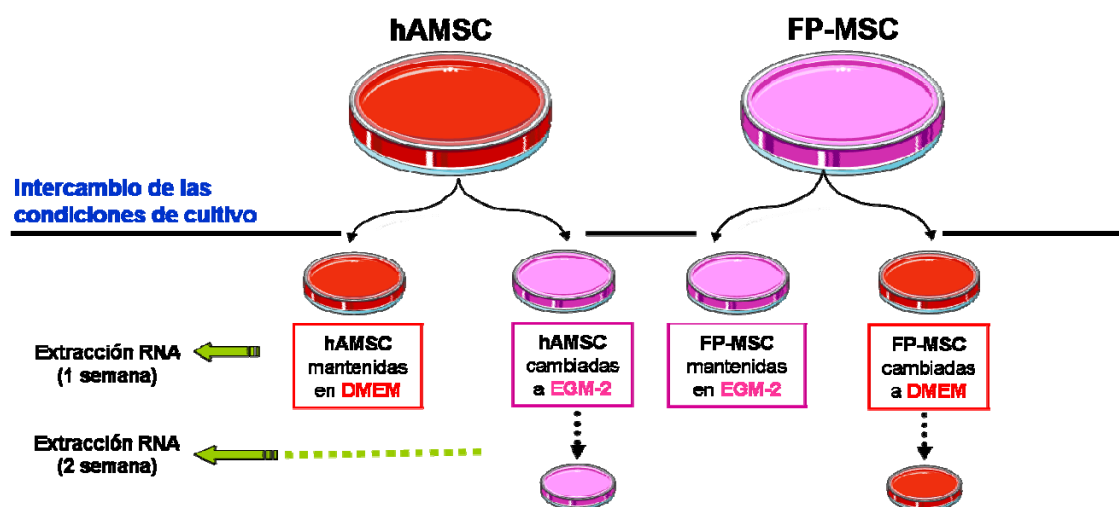


Figura 29: Esquema del proceso de intercambio de las condiciones de cultivo en la población celular del paciente L020609.

		Fold Change (FC) Respecto su Medio Original			
Control (sin intercambio de medios)		hAMSC cambiadas a EGM-2		FP-MSC cambiadas a DMEM	
		1 semana	2 semanas	1 semana	2 semanas
ALOX15B	110,62	273,32	480,37	-17,10	-19,32
AREG	11,24	15,35	9,77	-16,21	-5,91
CCL20	1,79	51,10	40,18	2,00	1,25
CNR1	17,76	6,88	3,36	-5,59	-5,41
CPM	7,90	7,80	10,26	-1,60	-1,64
EFNB2	4,02	4,36	2,32	-2,06	-2,01
FKBP5	5,35	4,20	4,46	-14,72	-12,15
HGF	3,10	1,28	2,23	-2,71	-3,11
HSD11B1	16,11	26,43	81,51	1,05	1,27
MAOA	12,11	1,97	4,72	-2,23	-2,82
PTGER2	14,20	5,93	15,70	-5,08	-3,09
ZBTB16	66,37	2593,13	881,02	-5,65	-5,91

Tabla 10: Resultados del análisis por RT-PCR para evaluar el efecto del intercambio de medio en las células de la paciente L020609. En esta tabla se representa el FC tras 1 o 2 semanas de cultivo en el medio contrario, respecto al medio original. Columna “Control”, es el FC de las células empleadas en este experimento sin cambiar sus condiciones de cultivo (FP-MSC versus hAMSC). Las columnas “hAMSC cambiadas a EGM-2” representan el cambio de expresión, respecto a las mantenidas en DMEM, después de una y dos semanas de cultivo con el cambio de medio a EGM-2. Las columnas “FP-MSC cambiadas a DMEM” representan el cambio de expresión, respecto a las mantenidas en EGM-2, después de una y dos semanas de cultivo con el cambio de medio a DMEM. En rojo, se representan la inversa de los valores cuyo FC ha sido inferior a 1.

A nivel celular, se realizó el mismo procedimiento que en el caso anterior para el clon M27, con gran capacidad proliferativa tanto en DMEM como en EGM-2. El clon M27 crecido en EGM-2 o DMEM (M27-E o M27-D, respectivamente), fue dividido en 2, una parte se mantuvo en el medio de partida, y la otra parte se cambió al medio contrario, según se muestra en la Figura 30. El ARN total extraído tras la primera y segunda semana de cultivo después del cambio, se analizó por RT-PCR para la lista de genes estudiados.

Después de la etapa de “intercambio de las condiciones de cultivo”, el clon M27-D, cambiado a medio EGM-2, pasa a sobre-expresar los genes que caracterizan el fenotipo FP-MSC excepto por dos genes (CCL20 y HGF) un patrón característico para este clon. Dentro del patrón general de expresión, los niveles de expresión de cada uno de los genes sufren cambios con el tiempo, como se puede observar en la Tabla 11.

RESULTADOS

En el caso del M27-E cambiado a DMEM, las células van reduciendo su velocidad proliferativa y los niveles de expresión de los diferentes genes “característicos” van disminuyendo en función al tiempo expuesto a DMEM. Los FC son inferiores a los del control, y aunque no se llega a los niveles basales, se muestra una clara tendencia a la disminución de la expresión de dichos genes. Parecería que el hecho de haber seleccionado el clon con mayor potencial proliferativo, para ese experimento en particular, haya resultado en cierta inercia y que el cambio de expresión en estos genes requiera mayor tiempo en DMEM.

Podemos concluir que el cambio de medio a DMEM revierte el fenotipo FP- MSC a hAMSC, tanto a nivel de velocidad de crecimiento celular como a nivel de expresión de los diferentes genes seleccionados, y que este fenómeno se observa tanto en la población heterogénea y como a nivel celular.

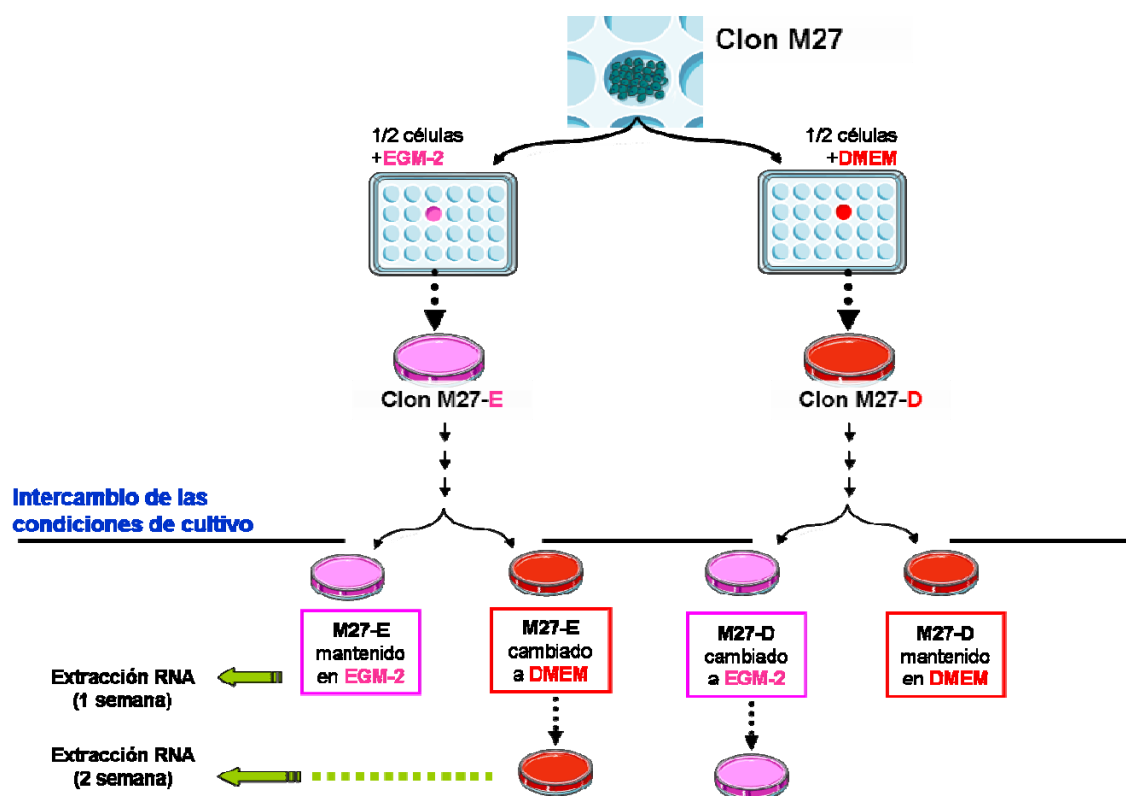


Figura 30: Esquema del proceso de intercambio de las condiciones de cultivo para el clon M27.

Fold Change (FC) Respecto su Medio Original

	Control (sin intercambio de medios)	M27-D cambiado a EGM-2		M27-E cambiado a DMEM	
		1 semana	2 semanas	1 semana	2 semanas
ALOX15B	837,43	2251,25	757,82	239,24	63,80
AREG	10,03	83,25	7,42	4,84	6,31
CCL20	54,05	69,43	158,21	13,12	21,00
CNR1	0,88	1,31	0,31	1,00	0,74
CPM	138,88	204,95	45,78	6,31	4,27
EFNB2	167,09	103,56	12,11	20,71	7,15
FKBP5	26,01	48,59	17,03	10,83	12,57
HGF	0,93	1,67	0,01	6,21	1,04
HSD11B1	40,92	61,06	11,09	10,62	5,30
MAOA	28,80	17,60	24,12	4,60	0,51
PTGER2	8,39	10,45	5,39	7,87	7,20
ZBTB16	4057,64	7984,37	4593,82	452,42	61,86

Tabla 11: Resultados del análisis por RT-PCR para evaluar el efecto del intercambio de medio en las células del clon M27. Columna “Control”, es el FC de las células empleadas en este experimento sin cambiar sus condiciones de cultivo (M27-E versus M27-D). Las columnas “M27-D cambiadas a EGM-2” representan el cambio de expresión, respecto a las mantenidas en DMEM, después de una y dos semanas de cultivo con el cambio de medio a EGM-2. Las columnas “M27-E cambiadas a DMEM” representan el cambio de expresión, respecto a las mantenidas en EGM-2, después de una y dos semanas de cultivo con el cambio de medio a DMEM.

8. Capacidad de formar estructuras tipo vascular in vitro

La capacidad de las hAMSC para diferenciarse a linaje endotelial está bien documentada^{55,146}.

El MatrigelTM, un material derivado de la matriz extracelular de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) que proporciona una variedad de factores capaces de inducir diferenciación celular, se emplea para evaluar la capacidad de diferenciación al linaje endotelial. Una vez las células son implantadas sobre esta matriz, comienzan una serie de cambios y reorganizaciones que culminan en la formación de estructuras tipo vascular que se pueden cuantificar de diversas maneras. En esta tesis se valoró la capacidad de formar estructuras tipo vascular, mediante la contabilización de círculos completamente cerrados (Círculos/mm²) en Matrigel, Los datos representados en la gráfica de la Figura 31 muestran el promedio del número de círculos formados por las hAMSC y las FP-MSC de todos los pacientes (n=6 pocillos por paciente y hora). Los análisis

RESULTADOS

de la formación tubulogénica muestran que las FP-MSC sembradas en Matrigel, no solo producen mayor cantidad de estructuras tipo capilar (* $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$), sino que además, están mejor organizadas y duran más en el tiempo que las hAMSC.

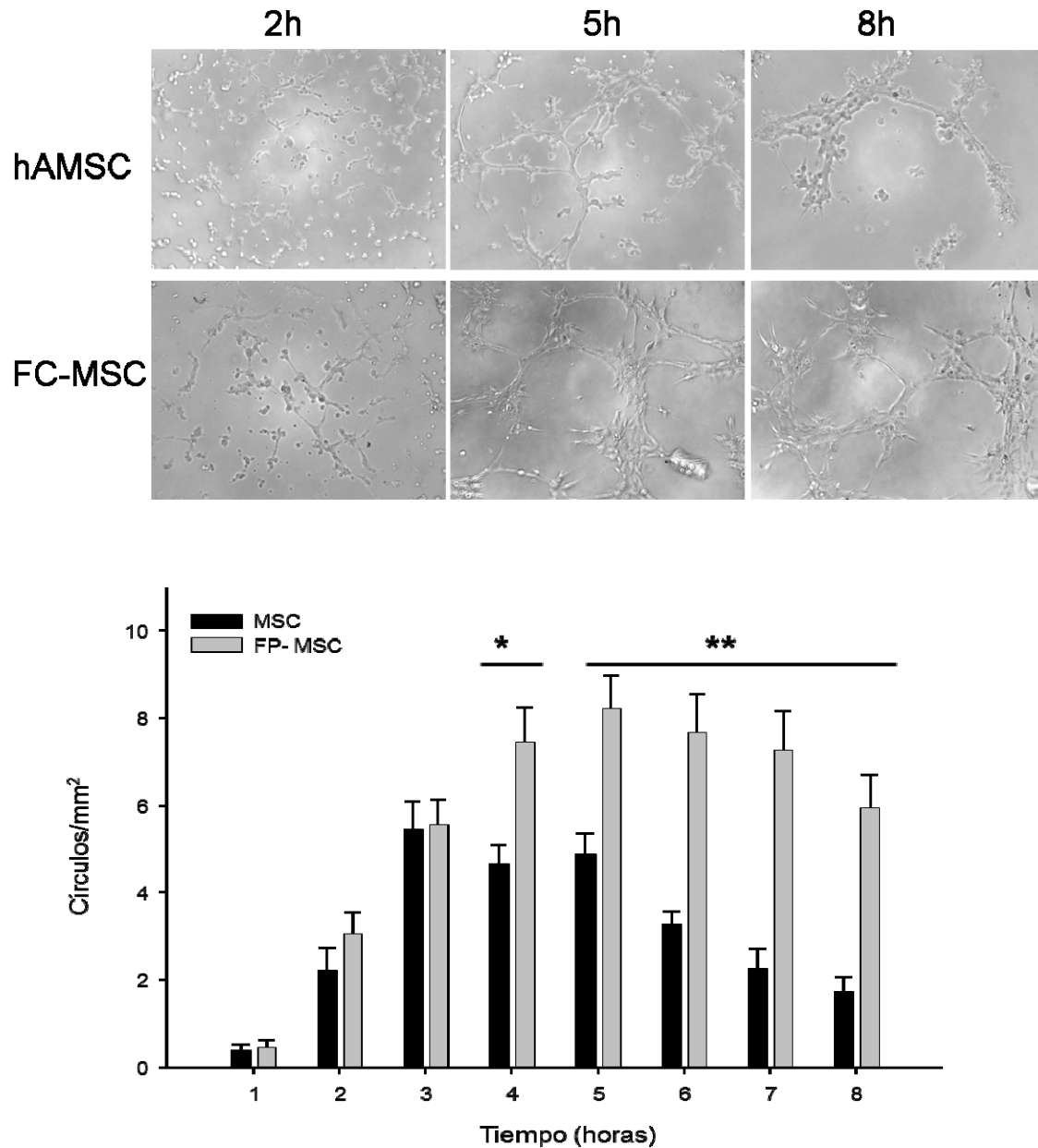


Figura 31: Panel superior, imágenes representativas de las estructuras tubulares generadas por hAMSC y FP-MSC en Matrigel a diferentes tiempos. Abajo, histograma representando los datos de capacidad de formación de estructuras de tipo vascular (círculos/mm²) en Matrigel™ *in Vitro* (prueba-t comparando los valores de FP-MSC con los de hAMSC para cada tiempo * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$).

II. APLICACIÓN DE LAS FP-MSC PARA TERAPIA CELULAR

Tal como describimos anteriormente, las FP-MSC son una fuente segura para obtener grandes cantidades de células. Si las comparamos con las hAMSC de las cuales provienen, se pueden conseguir la misma cantidad de células en un periodo 4.4 veces más corto, es decir, si queremos producir 10^{10} células, necesitaremos dos meses y medio de cultivo de hAMSC y poco más de una quincena con las FP-MSC. El tiempo que se gana, en este caso prácticamente dos meses, puede ser crítico para el paciente y ello confiere una gran ventaja a las FP-MSC en tratamientos con células autólogas. La modificación de la función biológica de migración, y la inducción de genes relacionados con procesos de reparación y anti-inflamatorios registrada en los arrays, junto a una mayor capacidad angiogénica *in vitro*, podría influir favorablemente en el transcurso del procedimiento terapéutico.

Con el fin de valorar el potencial de aplicación terapéutica de las FP-MSC las comparamos con las hAMSC originales, en varios modelos bien establecidos de terapia celular, el tratamiento contra el cáncer y la terapia regenerativa, concretamente regeneración cardiaca.

1. Tratamiento contra el cáncer

Existen diversas formas de terapia celular y/o génica contra el desarrollo del cáncer.

En nuestro caso, comparamos la eficiencia de estos dos tipos celulares como vehiculo de diferentes genes suicidas en el tratamiento de un tumor. Se emplearon dos modelos de tumor bien establecidos en ratones SCID: (1) implantación de U87 (línea celular de glioma humano) en el cerebro del ratón, y (2), inoculación de PC3 (línea celular de cáncer de próstata humano) en los muslos del ratón. En ambos modelos estudiamos el efecto de diferentes genes

citotóxicos, en la población de células tumorales, mediante seguimiento de imágenes no invasivas de bioluminiscencia.

La eficiencia del tratamiento va a depender de conceptos tan complejos como son la interacción de la célula terapéutica con la célula tumoral, por ello la elección de un tipo celular adecuado va a determinar si el tratamiento puede ser efectivo o no.

1.1 Modelo de glioma en ratones SCID tratado con Timidin-Kinasa (TK)

La estrategia terapéutica consiste en utilizar células como vehículos genéticamente modificados para expresar enzimas que convierten pro-fármaco no tóxico, en sustancias tóxicas que, no solamente matan a las células terapéuticas sino también a las vecinas. Esta estrategia tiene la ventaja de producir concentraciones de agentes citotóxicos relativamente elevadas solo en la proximidad de las células tumorales por lo cual no tiene efectos sistémicos.

La estrategia de nuestros experimentos consistió en marcar tanto los tumores como las células terapéuticas con genes de luciferasas y proteínas fluorescentes. Esto nos permite monitorizar y cuantificar el comportamiento celular en animales vivos mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI).

Para conocer la eficiencia de las FP-MSC en el tratamiento de gliomas, se usaron diferentes genes trazadores de luciferasas, que nos permitieron monitorizar *in vivo* los cambios en la dinámica de ambas poblaciones: las células terapéuticas y las células tumorales. Las células tumorales U87 se trasfectaron con la construcción Pluc-ires-EGFP y las células terapéuticas (FP-MSC y hAMSC) se trasfectaron con el vector CMV:hRLluc:RFP:tk; que codifica para una proteína quimérica triple portadora de: Renila luciferasa (Rluc), RGF, y una versión truncada de la timidin- kinasa del virus *herpes simplex*, todo ello regulado bajo el promotor constitutivo CMV. La TK es capaz de fosforilar la pre-fármaco ganciclovir (GCV) y convertirla en su forma activa (di y trifosfato) que tienen un efecto tóxico en la célula, conduciéndola a la muerte.

En estos experimentos se inocularon conjuntamente U87 y FP-MSC o hAMSC en una proporción 1:4 por duplicado, un grupo recibiría la pre-fármaco y el otro

PBS, como grupo control se implantaron U87 solas, cada grupo consta de una n=7. Después del 5º día de la implantación, se administró diariamente, durante toda la extensión del experimento, GCV a 100mg/Kg de ratón.

En la Figura 32, se representa la dinámica de la población de las U87 en los diferentes grupos estudiados, mediante el seguimiento *in vivo* por BLI. De todas las condiciones ensayadas, sólo el grupo hAMSC + GCV presenta un efecto negativo sobre el crecimiento de las U87; se observa una reducción del tamaño del tumor del 93%, en comparación con el grupo control U87 solas. El grupo FP-MSK + GCV no mostró efectos citotóxicos visibles. Contrariamente a lo que cabía esperar, el tumor aumento 32.4 veces con respecto a las U87 solas. Los controles hAMSC+PBS y FP-MSK+PBS, también promocionaron el crecimiento del tumor, 23.7 y 15.8 veces respectivamente.

Estos datos cuestionan la eficiencia de las FP-MSK como portadoras del efecto citotóxico mediado por el gen TK en un tratamiento anti-tumoral. Una de las explicaciones que se barajan, es si estas células establecen o no algún tipo de unión con las células tumorales; según los datos publicados^{182,183} la TK requiere de uniones tipo gap para tener un efecto citotóxico en las células vecinas. Puede ser que las FP-MSK, a diferencia de las hAMSC, no establezcan este tipo de uniones y por ello no interfieran negativamente con el crecimiento de las U87.

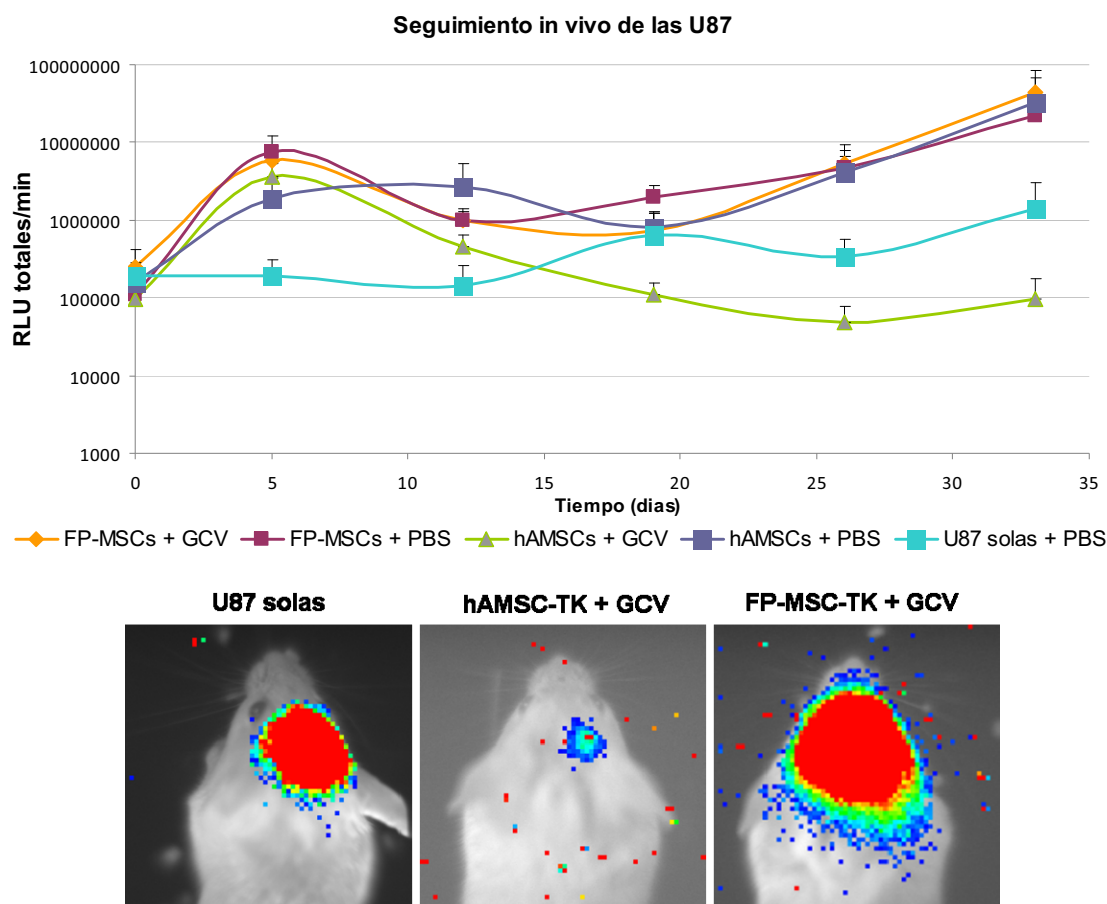


Figura 32: Seguimiento *in vivo* de los tumores U87 en un modelo de glioma en ratón. Panel superior, la gráfica muestra la cantidad de luz generada por las células tumorales en función del tratamiento, a los tiempos indicados. El tratamiento con GCV se inició el día 5, n=7. Panel inferior, imágenes representativas mostrando la emisión de luz por los tumores tras 28 días de tratamiento.

1.2 Modelo de tumor de próstata PC3 ectópico en ratón SICD tratados con CDUPRT.

El experimento anterior sugirió que la falta de eficacia de las FP-MSC en el tratamiento del glioma U87 podría ser debida a la necesidad de establecer interacciones entre las células terapéuticas y tumorales. Por ello, decidimos probar un tipo de gen suicida que no requiriese la intervención de contactos inter-celulares. Elegimos la fusión génica citosina desaminasa con uracilo fosforibosiltransferasa (CDUPRT), esta construcción es capaz de convertir la pro-droga 5-fluorocitosina (5-FC) en 5-fluoro-uridina monofosfato (5-FUMP), un

componente tóxico capaz de matar a la célula que lo porta y por efecto colateral a la célula vecina, sin necesidad de estar en contacto con ella.

Para este estudio, nos centramos en el estudio del efecto terapéutico únicamente de las FP-MSK y además, cambiamos a un modelo de tumor de próstata PC3 ectópicamente implantado en muslo de ratón SCID, que además de ser más accesible nos daba la oportunidad de tener en el muslo contralateral del mismo animal el tumor control no tratado

Se transfectaron las células FP-MSK con el vector CDUPRT-puro y posteriormente fueron seleccionadas gracias al gen de resistencia a puomicina que llevaba incorporado el vector, permitiéndonos tener una población 100% transfectada con el gen de la CDUPRT. Una vez seleccionadas, se realizó una segunda transfección con el vector CMV:hRLuc:RFP:tk para incorporarles el reporter Renila luciferasa (RLuc) para su seguimiento. Las células tumorales fueron transfectadas con CMV-Pluc-ireEsp-EGFP

La 5-FC a determinadas concentraciones resulta ser tóxica para algunas células. Comenzamos por determinar la concentración de profármaco a la que se debería trabajar. Para ello, se analizó el porcentaje de viabilidad de las diferentes células a concentraciones crecientes de 5-FC. Sembramos para cada tipo celular (PC3, FP-MSK y FP-MSK portadoras del gen CDUPRT) y concentración, 4 pocillos con 3000 células en placas de 96 pocillos, y se incubaron durante 5 días. Para determinar el número de células viable empleamos un ensayo colorimétrico comercial basado en una reacción de reducción de uno de sus componentes llevado a cabo por las células vivas, y cuyo producto coloreado se puede detectar en un espectrofotómetro de placas. Tal como se observa en la Figura 33 las células PC3 no sobreviven a partir de la concentración 250 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC, sin embargo, las FP-MSK que no llevan el gen suicida, se mantienen viables independientemente de la concentración. En el caso de las FP-MSK portadoras de la CDUPRT, se observa una caída progresiva en el número de células vivas proporcional a la cantidad de 5-FC, a partir de los 300 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje de células que sobreviven se mantiene relativamente constante. Basándonos en estos resultados, tomamos como

RESULTADOS

concentración de trabajo: 100 $\mu\text{g/ml}$, concentración a la cual se observa una caída importante en la viabilidad de las células portadoras de la CDUPRT, al 35%, y las tumorales pueden sobrevivir al efecto tóxico propio de la pre-fármaco (sobreviven un 65% aproximadamente).

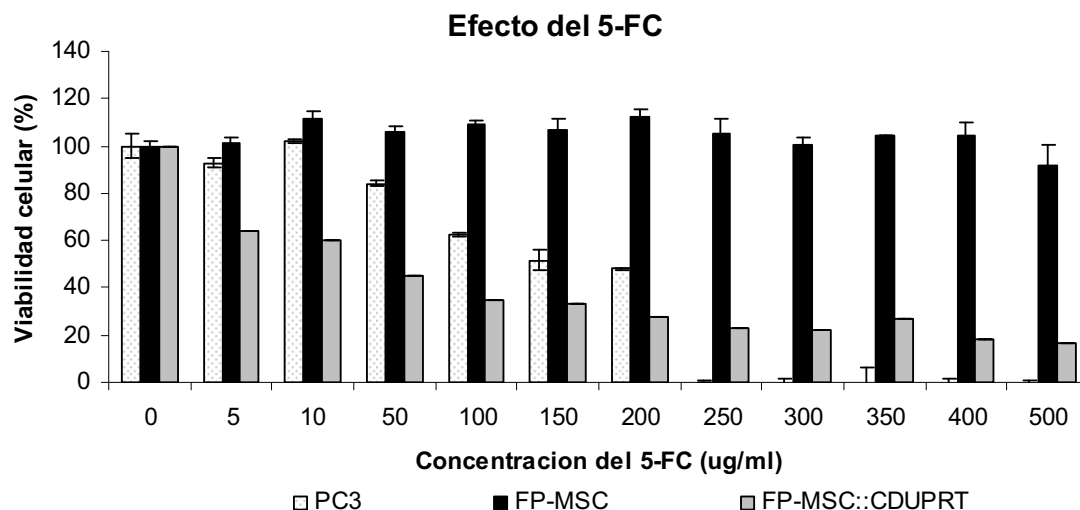


Figura 33: Ensayo de viabilidad celular. Efecto de la concentración del pre-fármaco 5-FC en la supervivencia de los distintos tipos celulares.

El siguiente paso fue confirmar, *in vitro*, si las FP-MSc que expresan el gen suicida CDUPRT eran capaces de afectar a las células adyacentes en cultivo, en este caso las PC3. En este experimento, determinamos la viabilidad celular por BLI. Como hemos mencionado anteriormente, cada tipo celular lleva una luciferasa diferente que además utiliza un sustrato no intercambiable. Este sistema nos permite conocer que ocurre con cada tipo celular dentro de un mismo pocillo de cultivo. Se sembraron en placas de 48 pocillos, 10.000 células por pocillo (10.000 PC3 o FP-MSc; 5.000 PC3 + 5.000 FP-MSc) con o sin 5-FC (100 $\mu\text{g/ml}$). Se determinó la luz emitida en cada pocillo por cada tipo celular el día 1 y 6.

En la Figura 34, se representan en base a los datos de bioluminiscencia el porcentaje de células que sobreviven en comparación con los controles no tratados. Cada valor proviene de la relación: "luz emitida por célula crecidas con 5-FC*100" / "luz emitida por células crecidas sin 5-FC". Se puede observar que el grupo control de las PC3 se ve afectado por la presencia de la pre-

fármaco, con una caída al 61% en su supervivencia celular; confirmándose los valores obtenidos previamente por el test de viabilidad. Del mismo modo confirmamos que 6 días de tratamiento con 5-FC, reduce la supervivencia de las FP-MSC portadoras del gen de la CDUPRT, al 32%. El efecto citotóxico colateral lo podemos comprobar en el grupo denominado “PC3+FP-MSC”, en estos pocillos, se analiza conjuntamente la luz de las dos células, PC3 y FP-MSC. En la categoría con nombre “PC3+FP-MSC” se analiza la luz emitida por las PC3 (PLuc), y en la categoría “FP-MSC+PC3” la luz emitida por las FP-MSC (RLuc) . Mientras que la caída de las FP-MSC en presencia de las PC3, es muy similar a la de las FP-MSC solas, hemos conseguido disminuir el % de supervivencia de las PC3 al 24%, con lo cual podemos interpretar que la diferencia entre el 61% (PC3 solas) y el 24% (PC3+FP-MSC) se debe al efecto citotóxico de las FP-MSC portadoras del gen de la CDUPRT.

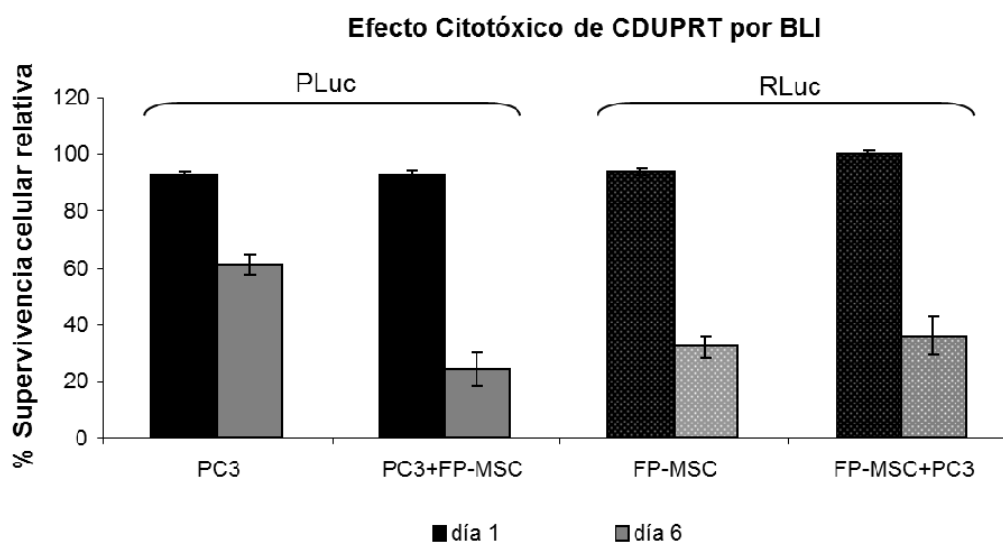


Figura 34: Efecto citotóxico colateral del CDUPRT mediado por las FP-MSC *in vitro*. Análisis obtenido en base a los datos de bioluminiscencias, específico para cada tipo celular. Cada barra representa el porcentaje de células que sobreviven en comparación con los controles no tratados. Las dos categorías de la izquierda: “PC3” Y “PC3+FP-MSC” se han obtenido mediante la cuantificación de PLuc de las PC3; Las dos categorías de la derecha “FP-MSC” Y “FP-MSC+PC3” mediante la cuantificación de la RLuc de las FP-MSC.

Para los estudios *in vivo*, se implantó intramuscularmente, una mezcla de PC3 y FP-MSC en una proporción 1:4, en uno de los muslos de ratones SCID,

RESULTADOS

mientras que en el muslo contralateral se implantó solo PC3, como controles internos. Los animales implantados se dividieron en dos grupos (n=6) según recibieron la pre-fármaco 5-FC o PBS. En la Figura 30, se recogen los valores de proliferación de las células PC3 a partir de los datos de BLI. Se observan claramente dos tendencias de crecimiento separadas por 3 órdenes de magnitud: el crecimiento de las PC3 solas y el de las PC3 con las FP-MSC. Las PC3 inoculadas en conjunto con las FP-MSC presentan una caída post-inoculación amortiguada y un crecimiento celular exponencial. Parece ser, que las FP-MSC tienen un efecto protector y/o estimulador en las PC3, superior al propio efecto citotóxico. Aunque en la gráfica los puntos de las PC3+FP-MSC, con y sin 5-FC, parezcan iguales, los datos muestran que el tratamiento con 5-FC reduce a la mitad el aumento de las PC3; sin embargo, en comparación con las PC3 solas, crecen del orden de 1000 veces más.

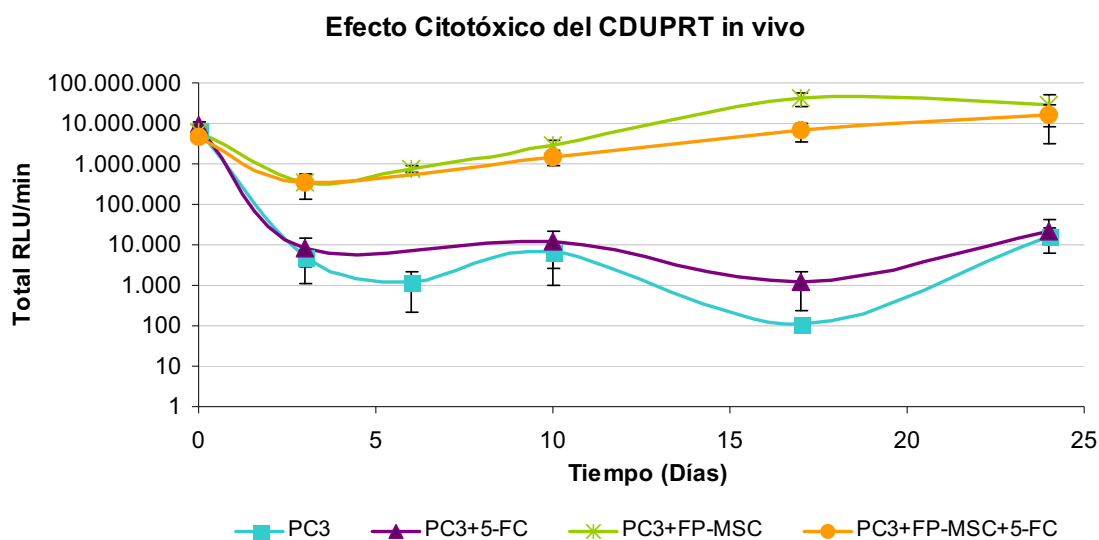


Figura 35: Efecto citotóxico de la CDUPRT *in vivo*. La gráfica, muestra la producción de luz por los tumores PC-3.PLuc resultante del tratamiento con las células terapéuticas indicadas y el pro-fármaco 5-FC.

Las FP-MSC han hecho que las células tumorales PC3 se desarrollen con gran agresividad, superando incluso cualquier efecto citotóxico que pretendiese

frenarlas. Posiblemente, sus propiedades paracrinas, inmunomoduladoras y/o angiogénicas han contribuido con este desmesurado desarrollo.

Los dos previos resultados sugieren que las células FP-MSC son de poca utilidad en el tratamiento de este tipo de tumores.

2. Regeneración tisular: Modelo de isquemia cardiaca

Uno de los modelos mejor estudiados de regeneración celular, es el de isquemia cardiaca murina. Este modelo se basa en la inducción de un infarto agudo de miocardio (IAM) mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Diferentes trabajos sugieren que la aplicación de hAMSC en IAM, mejora la estructura y función cardiaca y aumenta la revascularización de la zona infartada, ya sea por propia diferenciación de las células implantadas o por efectos de la secreción de determinadas citoquinas.

En el último capítulo de este trabajo, comparamos la aplicabilidad de las FP-MSC con las hAMSC en un modelo de isquemia cardiaca en ratón, utilizando parches de fibrina como soporte de las células.

2.1 Estrategia de trabajo

Con el objetivo de conocer mejor el comportamiento de las células implantadas en el miocardio, empleamos una plataforma de seguimiento *in vivo* por imágenes BLI.

Usaremos diferentes genes trazadores de luciferasas, que nos permitirán monitorizar *in vivo* cambios a nivel de expresión génica. Para ello, las hAMSC y FP-MSC fueron doblemente transducidas, primero: con el vector de expresión constitutiva CMV:hRLuc:RFP, cuya expresión constitutiva se utilizará como sistema de referencia, y a continuación, con un vector hPECAM-1p:Pluc:EGFP o hcTnI1p:Pluc:EGFP, para la expresión inducible de una segunda luciferasa (que servirá como reporter de diferenciación al linaje endotelial o cardiomiocítico, respectivamente, tal como se representa en el esquema de la Figura 31). Las células así marcadas se sembraron en una matriz de fibrina y a continuación fueron implantadas en la zona infartada del ventrículo.

RESULTADOS

La combinación de estos dos tipos de vectores nos permitirá monitorizar importantes parámetros en la regeneración cardiaca, como son: la viabilidad celular, determinado por la luz regulada por el promotor constitutivo y la capacidad de diferenciación a linaje cardiaco y endotelial, obtenido a partir de la relación entre la emisión de luz regulada por el promotor constitutivo y la luz emitida y regulada por el promotor específico

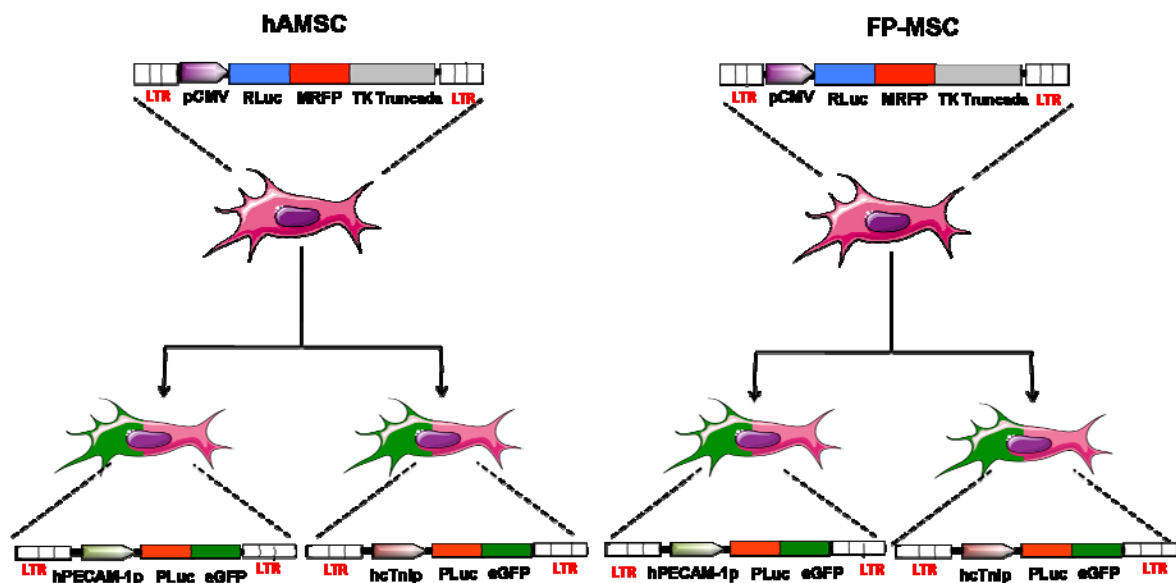


Figura 36: Esquema de las construcciones lentivíricas utilizadas y estrategia de transducción en hAMSC y FP-MSC.

2.2 Estudio *in vivo* por bioluminiscencia

Las células implantadas en la zona infartada del ratón fueron monitorizadas durante un periodo de 3 semanas, se tomaron imágenes semanalmente de la cantidad de luz generada por los dos tipos de luciferasa.

La cuantificación de fotones emitidos por las diferentes luciferasas en los dos tipos celulares muestran un incremento con el tiempo en la relación PLuc/RLuc: tanto cuando el promotor inducible es hPECAM-1p como cuando es hcTnIp. Estos resultados sugieren que ha habido un cambio en la expresión de genes relacionados con la diferenciación a linaje cardiaco y endotelial, respectivamente. Durante la primera semana, el cociente PLuc/RLuc fue más alto en las hAMSC, comparado con las FP-MSC. Sin embargo, en la segunda

semana el mismo cociente en las FP-MSC aumenta hasta superar los valores de las hAMSC, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Cuando comparamos la expresión específica de ambos genes en la semana 2, observamos una expresión de Troponina más alta que la de PECAM1, en los dos tipos celulares, estas diferencias fueron significativas con respecto a la semana 0 (* $p < 0.05$, † $p < 0.1$) (Figura 37).

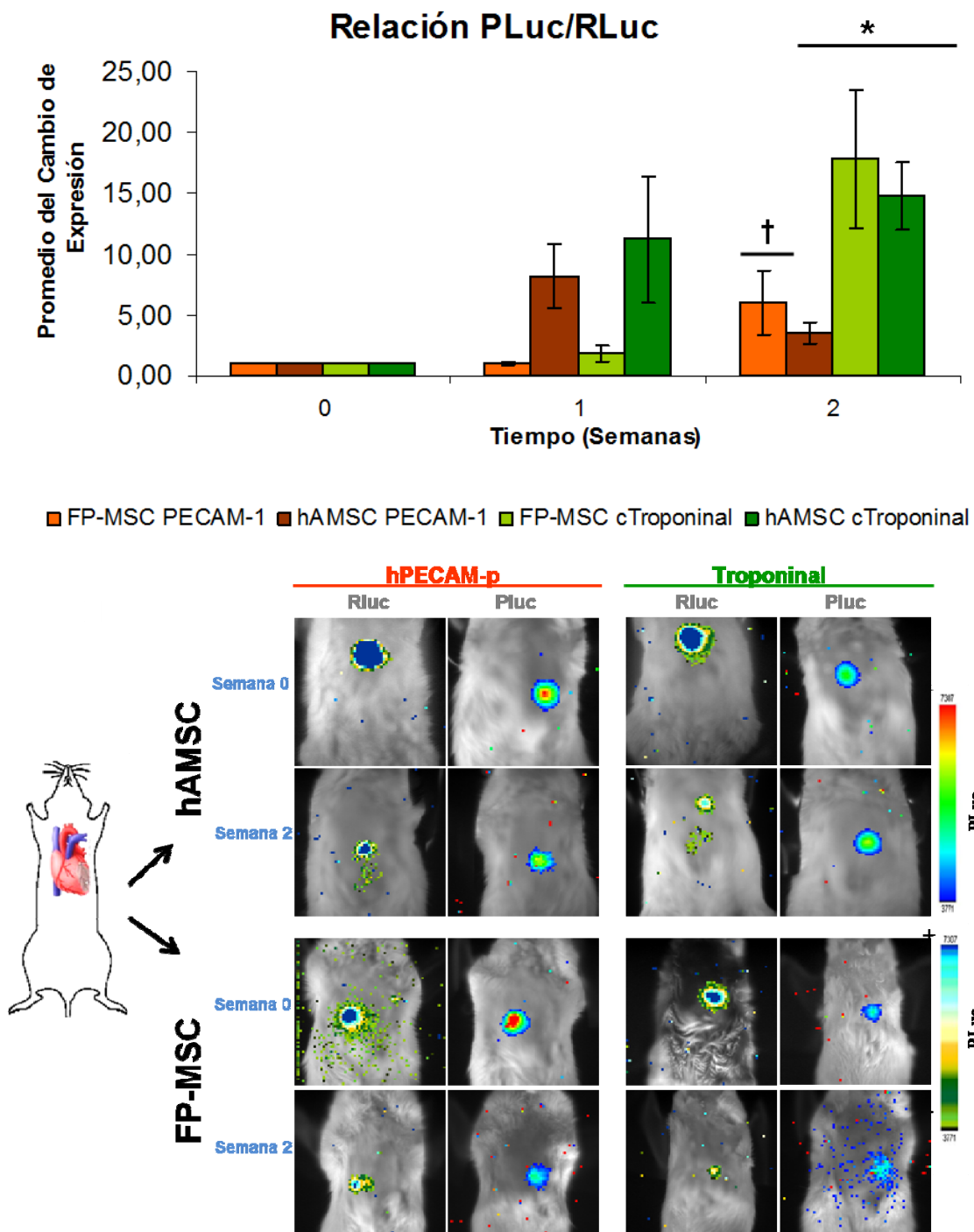


Figura 37: Monitorización de cambio de expresión génica mediante BLI *in vivo*. Panel superior histograma mostrando los resultados del cociente Pluc/RLuc medio en el tiempo, que muestra el incremento en la expresión de PECAM-1 y Troponinal con respecto a la semana 0. Panel inferior, imágenes representativas mostrando a tiempo 0 y 2 semanas la expresión de luciferasa regulada por promotores constitutivos (columnas RLuc) y la regulada por el promotor específico hPECAM-p (columna RLuc de la izquierda), o hcTnPlp (columna RLuc de la derecha).

2.3 Identificación de las células trasplantadas

Después de 3 semanas de la implantación de las células, los ratones fueron sacrificados. Los corazones extirpados fueron analizados *ex vivo* mediante un sistema de imagen de bioluminiscencia y fluorescencia. La Figura 38 muestra la presencia del parche en la zona infartada (extrema izquierdo). Las imágenes de bioluminiscencia y epifluorescencia ratifican la presencia de las células implantadas después del periodo de estudio; incluso, se puede detectar la señal GFP indicativa de la expresión específica de los genes hPECAM-1p o Troponinal.

Corazón *ex vivo*

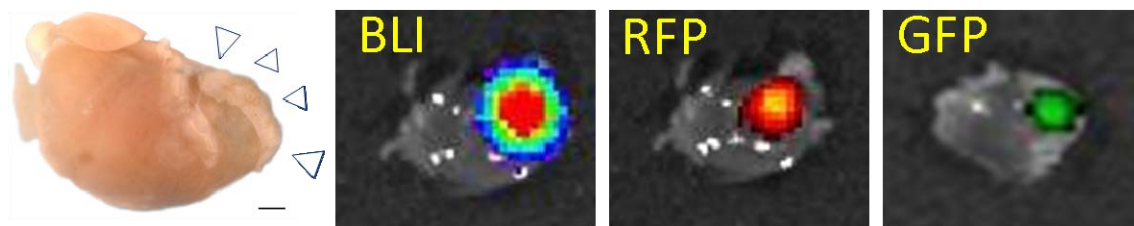


Figura 38: Imágenes de un corazón entero después de las 3 semanas de observación por BLI. Izquierda, las puntas de las flechas señalan el parche de fibrina sobre la zona infartada, la zona más pálida. Imágenes de bioluminiscencia y fluorescencia están sobrepuestas a imágenes en blanco y negro del mismo corazón. Barra de escala, 1mm.

También se llevó a cabo análisis histológico de los corazones. Los resultados del análisis por microscopía confocal confirmaron, en todos los casos, la presencia de células rojas fluorescentes dentro del parche de fibrina, correspondiéndose con las hAMSC y FP-MSC que constitutivamente expresan RFP regulado por el promotor del CMV.

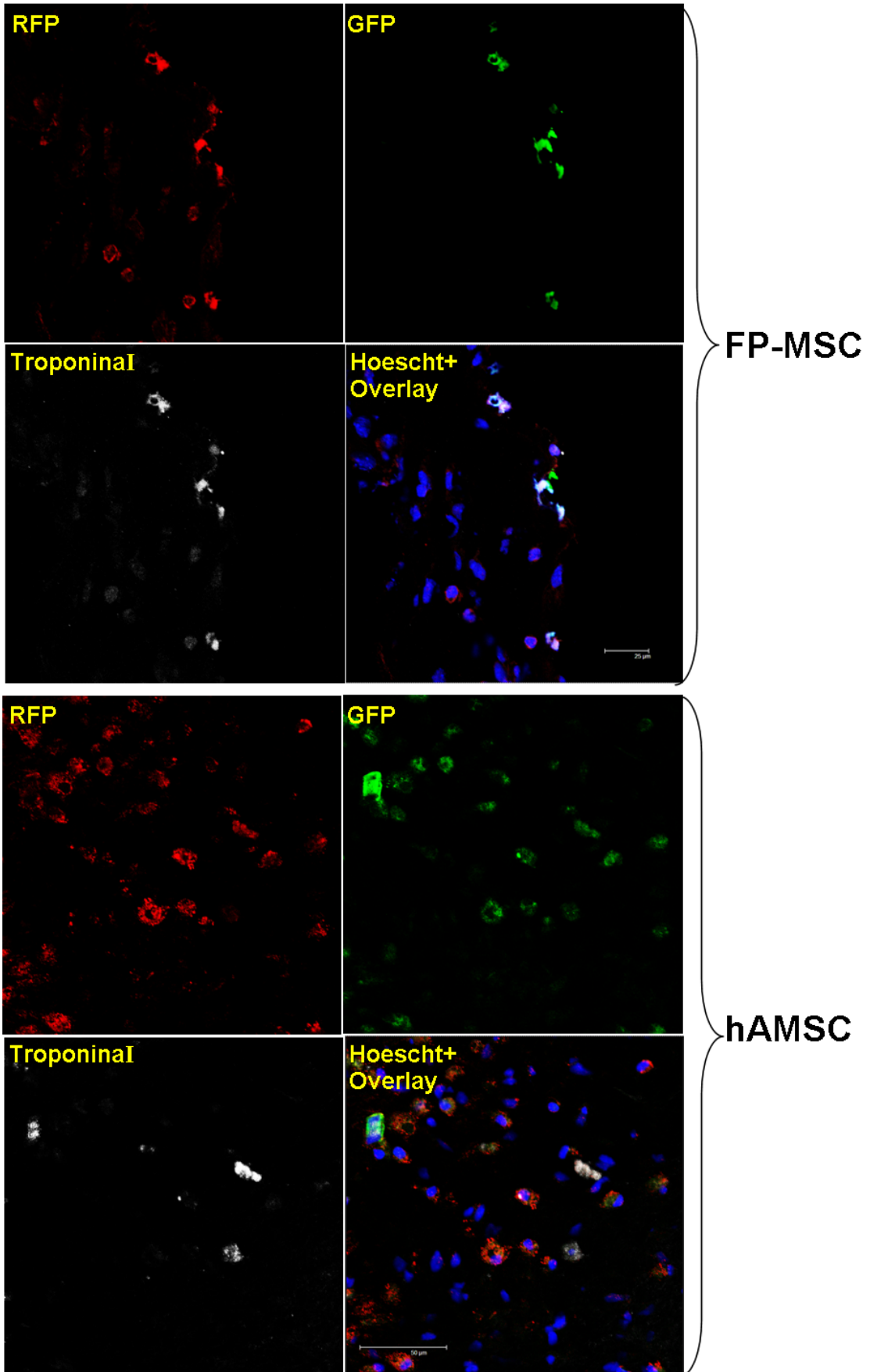
La detección de señal GFP (hPECAM-1p:PLuc:eGFP y hcTnlp:PLuc:eGFP) en las células implantadas, indica la actividad de los promotores PECAM1 y Troponinal, corroborándose los resultados obtenidos por BLI. Para demostrar la presencia de las proteínas PECAM1 y Troponinal, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas anti-PECAM-1 y anti-Troponinal, respectivamente. Los resultados corroboran que ambos tipos celulares se diferenciaron a linaje

RESULTADOS

endotelial y cardiaco. La expresión de la proteína co-localizaba con la señal GFP (Figura 39).

TroponinaI

A



hPECAM-p

B

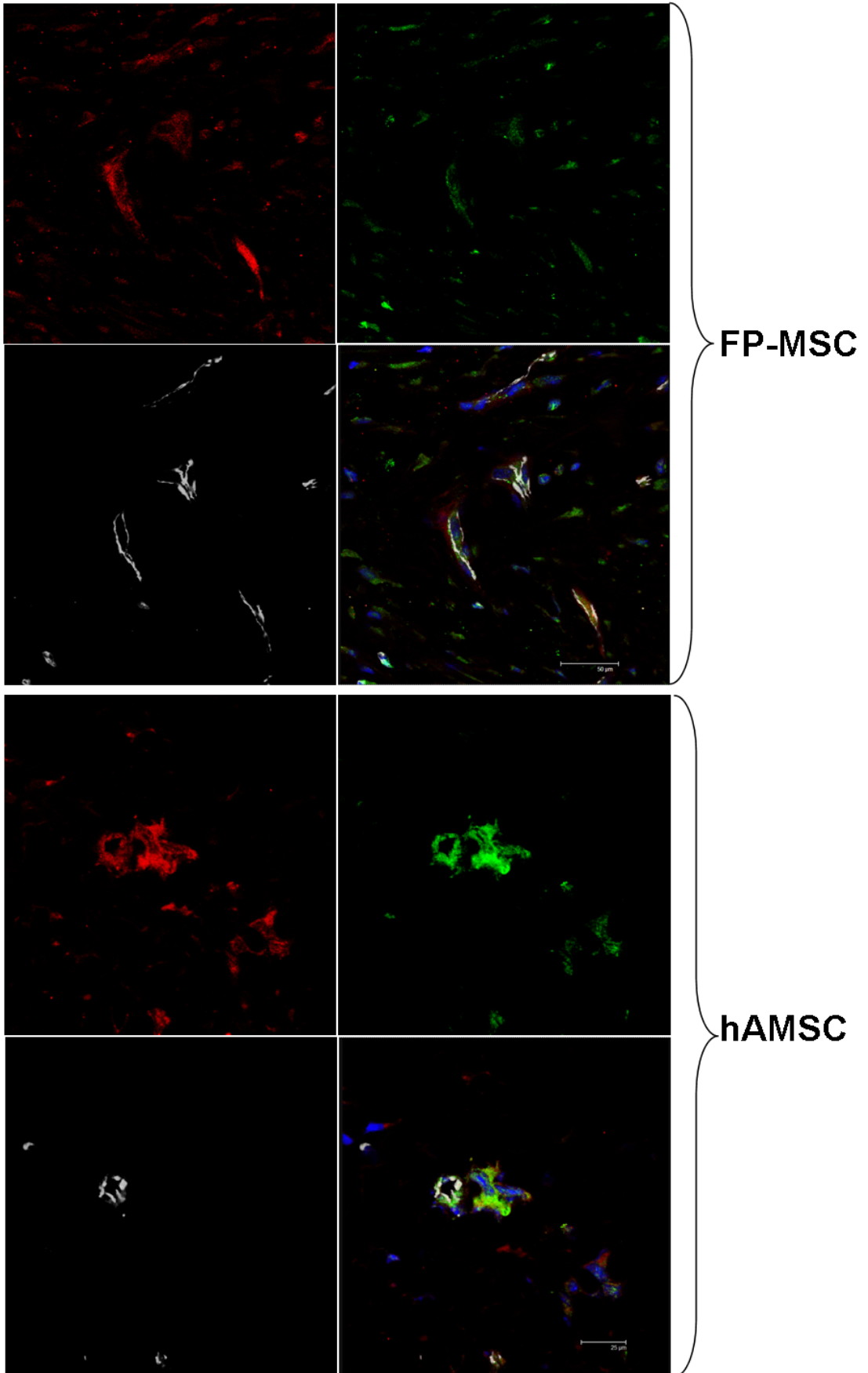


Figura 39: Validación mediante análisis histológico de los resultados de BLI. Las imágenes de microscopía confocal fluorescente muestran los trazadores RFP (células implantadas) o eGFP células diferenciadas, al linaje cardiomiocítico, (promotor de troponina) (A) o al linaje endotelial (promotor de PECAM1) (B). En cada caso, las cuatro imágenes superiores corresponden a células FP-MSC, y las cuatro imágenes inferiores corresponden a células hAMSC. La tinción con anticuerpo anti-Troponina o anti-Pecam, se muestra en blanco (imagen inferior izquierda de cada grupo). La superposición de las imágenes anteriores más la tinción Hoescht se indica como “Hoescht+Overlay” (imagen inferior derecha de cada grupo).

2.4 Función cardíaca

Una vez comprobada la capacidad para diferenciarse de ambos tipos celulares, estudiamos la contribución de estas células a la mejora de la función cardíaca mediante análisis de la densidad vascular, análisis morfométrico y ecocardiografía

- Análisis de la densidad vascular

Para estudiar el efecto del implante en la densidad vascular, se generaron secciones de miocardio de la zona del implante y se determinó la proporción del área vascular mediante tinción con lectina GSLIB4, específica para las células endoteliales. Se tomaron imágenes tanto de la región del margen del infarto como de la zona más distal, no se observaron diferencias significativas entre estas dos zonas, no considerándose como una variable.

Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo de la fracción del área vascular en aquellos corazones que han sido tratados. Los ratones tratados con los implantes con células, presentan valores significativamente superiores a los del grupo control MI+Fibrina. Sin células, tanto para las hAMSC como para las FP-MSC, $137.70 \pm 28.21\%$ y $159.05 \pm 39.48\%$, respectivamente ($p < 0.05$), aunque la diferencia entre los dos tipos de células no son significativas. El grupo control MI+Fibrina presenta también un aumento en la densidad vascular con respecto al grupo control MI sin fibrina ($76.44 \pm 21.58\%$ y $40.11 \pm 8.61\%$, respectivamente), lo cual sugiere que la propia fibrina tiene un efecto positivo en la formación de vasos ($p < 0.05$) (Figura 40).

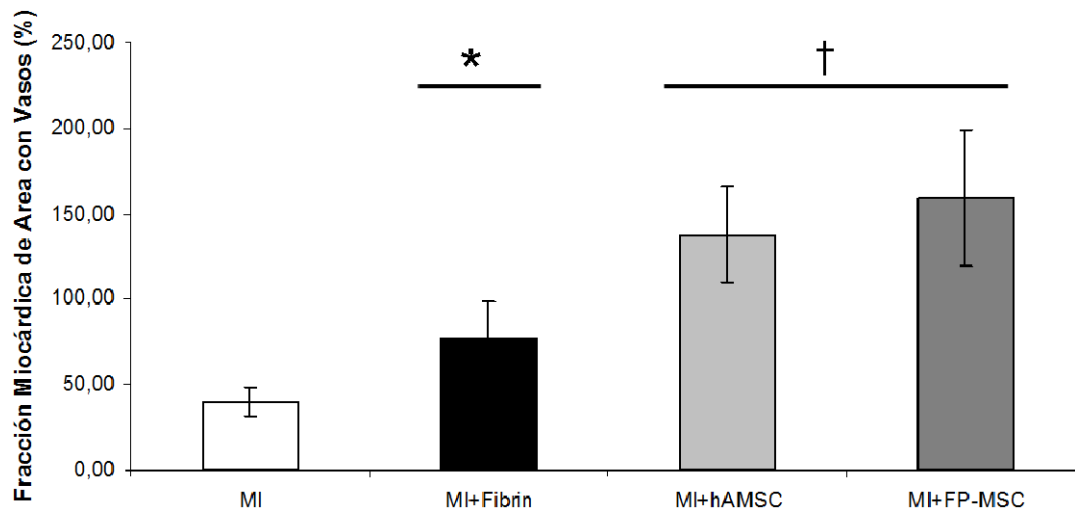


Figura 40: Efecto vasculogénico del procedimiento terapéutico. El histograma muestra el porcentaje de área vascular en los grupos control y tratados (* $p < 0.05$; † < 0.005 respecto al grupo MI sin fibrina). Los valores se representan como media \pm SD.

- Análisis morfométrico

La tinción tricrómica de Masson nos permite diferenciar entre cardiocitos sanos y la matriz de colágeno, resultado de la cicatriz del infarto. Mediante esta tinción podremos analizar morfométricamente los corazones, nos permitirá calcular el tamaño de la cicatriz del infarto después de 3 semanas del trasplante, y por consiguiente evaluar el estado de reparación del miocardio. El área infartada se calcula como el promedio de las superficies ricas en colágeno respecto al promedio de la superficie total del ventrículo izquierdo.

El análisis morfométrico muestra que los corazones que recibieron el trasplante celular, tienen una cicatriz superior al de los dos grupos controles, aunque estos valores no son estadísticamente significativos, en ninguno de los grupos: MI+Fibrina, MI+hAMSC y MI+FP-MSC, respecto al grupo control MI (Figura 41).

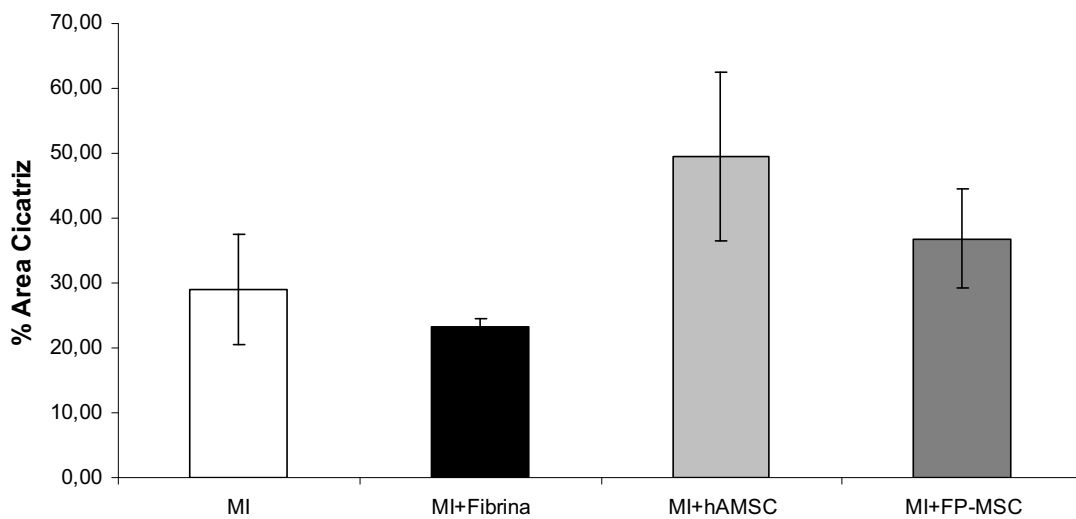


Figura 41: Evaluación del tamaño de cicatriz. El histograma muestra el porcentaje de área de cicatriz con respecto al área total del ventrículo izquierdo. Los valores se representan como media \pm SD.

Este tipo de análisis tiene ciertas limitaciones, ya que el tamaño de la cicatriz va a depender mucho del tamaño del infarto provocado, del cual no tenemos valor de referencia. Por ello, se valora mucho más análisis que se pueden realizar a lo largo del desarrollo del experimento, sin la necesidad de sacrificar a los animales, como es el caso de las ecocardiografías.

- Ecocardiografías

La función cardiaca se evaluó a partir de la fracción de eyección (FE) calculada a partir de ecocardiografías. Imágenes ecocardiográficas transtorácicas en el modo M fueron tomadas en diferentes tiempos: pre-infarto (datos basales), post-infarto (2 días después de provocarles el infarto) y pre-sacrificio (después de 3 semanas del infarto). La FE calcula la disminución del volumen del ventrículo izquierdo del corazón en sístole (contracción), respecto a la diástole (reposo). De modo que, una FE del 50% significa que el corazón al contraerse reduce el volumen de su ventrículo izquierdo a la mitad, respecto a su posición relajada. A mayor FE, más volumen de sangre es expulsado a través de la aorta durante el periodo de contracción.

RESULTADOS

En la gráfica de la Figura 42, se representan los cambios sufridos en la FE después de la inducción del infarto y antes de sacrificarlos. El decremento de FE post-infarto, se determinó a partir de la diferencia entre los datos basales (pre-infarto) y los datos post-infarto; del mismo modo, la diferencia entre los datos pre-sacrificio y los valores post-infarto nos indican el grado de recuperación de FE para cada grupo. El decremento post-infarto varía entre los diferentes grupos, lo que refleja la variabilidad en la generación de las isquemias. En base a estos datos, podemos detectar que los animales tratados con Fibrina y con Fibrina+FP-MSK, presentan los valores más alto de mejora respecto al grupo control MI, 18.40 y 17.48% respectivamente. Los ratones tratados con Fibrina+hAMSK presentan un valor medio de mejora, ligeramente superior al del control MI sin Fibrina (10.31 frente al 8.96%). Como en el caso del análisis de vascularización, la fibrina por si sola parece tener un efecto positivo detectable, superior al propio efecto de las hAMSK.

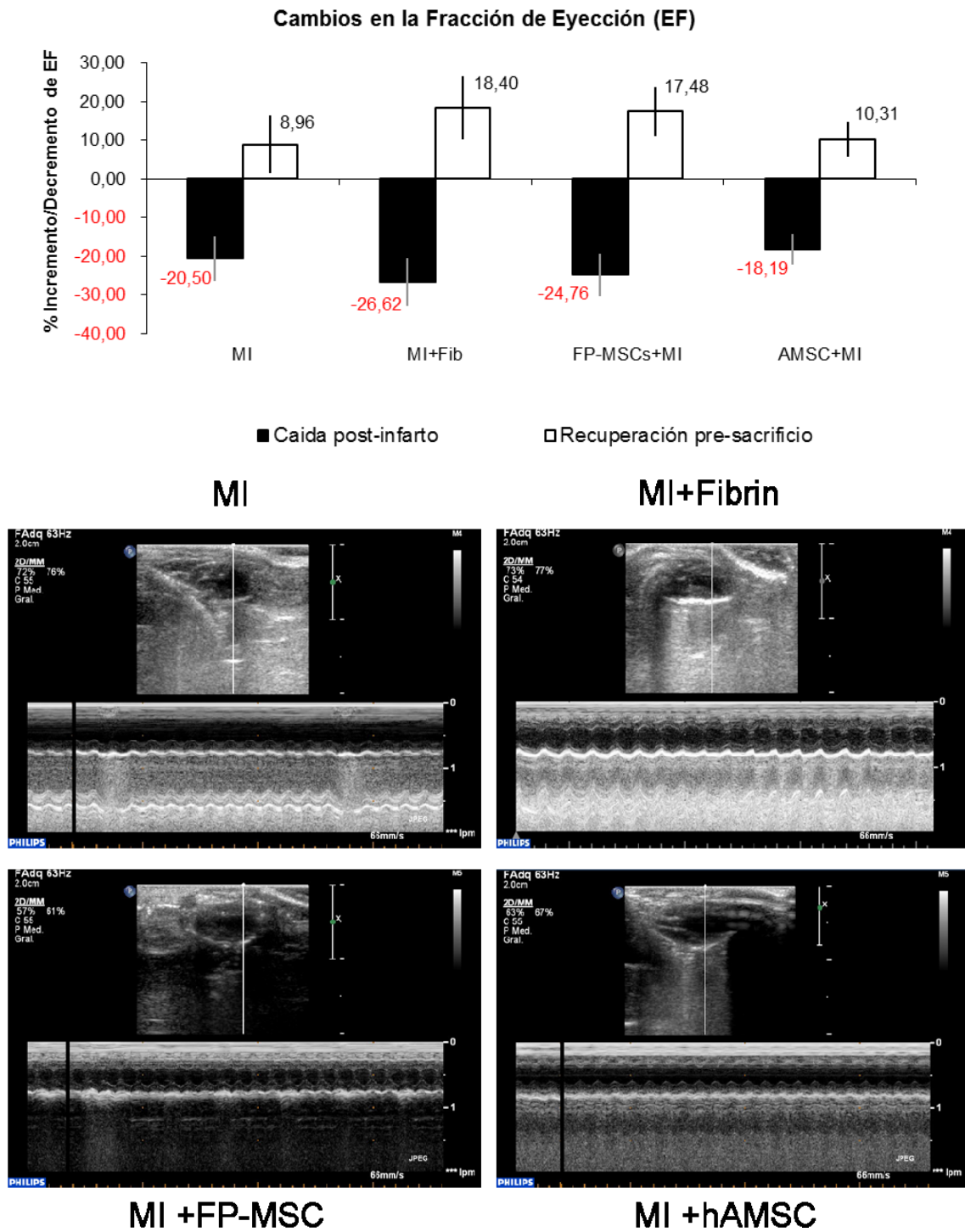


Figura 42: Análisis ecográfico de la fracción de eyección. Panel superior, histograma mostrando los valores de los cambios sufridos en la FE durante el experimento. Barras negras: caída de la FE después de la inducción del infarto, barras blancas: recuperación de la FE al finalizar el experimento. Los valores se representan como media ± SD. Panel inferior, ecocardiografías representativas correspondientes a los diferentes grupos antes de sacrificarlos.



DISCUSIÓN

La terapia celular con hAMSC es hoy en día una realidad. Las hAMSC son consideradas células capaces de promover la regeneración y la reparación de los tejidos dañados, por ello, tienen un inmenso potencial en la medicina regenerativa y la terapia celular. Sin embargo, para su uso en aplicaciones clínicas, particularmente en el tratamiento de grandes lesiones, es necesario realizar grandes expansiones *in vitro*.

Hemos detectado, que la exposición de las hAMSC al medio EGM-2 las dota de un fenotipo altamente proliferativo, lo cual les concede un especial atractivo para su uso en terapia celular. Propiedades similares, fueron descritas por primera vez en hAMSC cultivadas en EGM-2 en el 2007, por el equipo de Yoshimura¹⁸⁴. En dicho trabajo, características como el tiempo de duplicación, la capacidad de diferenciación, o los marcadores de superficie fueron comparados entre las células crecidas en DMEM y EGM-2.

El medio EGM-2 se emplea generalmente en el cultivo de células endoteliales. Sin embargo, recientemente, el EGM-2 se ha empezado a utilizar con otros fines; se usa tanto para promover la inducción a diferenciación a célula endotelial en células madre adulta¹⁸⁵ o embrionaria¹⁸⁶, como para cultivar células no-endoteliales, como por ejemplo células dendríticas¹⁸⁷ o progenitoras de músculo liso^{188, 189}. Hasta la fecha, pocos trabajos han utilizado este medio para cultivar hAMSC. En esta tesis, hemos profundizado en la caracterización de dichas células explorando su seguridad y aplicabilidad en diferentes modelos de terapia celular. A un nivel más fundamental, nos hemos planteado si el fenotipo específico FP-MSC era reproducible a nivel celular, y si dicho fenotipo, intimamente ligado al medio de cultivo, era una propiedad reversible para estas células.

Las cantidades de células que se requieren en terapia celular son muy variables, dependiendo del proceso terapéutico en particular y del autor del estudio. Sin embargo, se podría utilizar como referencia un valor del orden de 2×10^6 células por Kg. de peso del paciente; lo que implicaría que para un individuo de 75 Kg. se necesitarían 1.5×10^8 células. El hecho que inicialmente

nos llamó la atención fue que las hAMSC crecidas en EGM-2, y que ahora denominamos FP-MSC, se dividen, aproximadamente 4.4 veces más rápidamente que las hAMSC crecidas en DMEM (tiempo de duplicación de 1.5 días frente a los 5.1 días respectivamente); esto se traduce en que para obtener un total de 10^{10} células, en EGM-2 se requiere poco más de quince días, mientras que en DMEM se necesita dos meses y medio de cultivo. Este es un factor relevante ya que el tiempo de cultivo *in vitro* se considera uno de los factores determinantes de la aparición de aberraciones genómicas^{88,89,90}. De hecho, diferentes ensayos clínicos con mesenquimales cultivadas en condiciones estándar, fueron incapaces de obtener 10^8 células en menos de 4 semanas^{190,191,192}. Muchos grupos dedican grandes esfuerzos a mejorar la productividad celular, ya sea por combinación de diferentes medios de cultivo o por adición de distintos agentes o factores de crecimiento^{49,50,51,52}. El medio EGM-2, en este aspecto, concede una gran ventaja a las células cultivadas en él ya que favorece considerablemente la proliferación celular, a la vez que mantiene la capacidad de duplicación poblacional máxima (PD) a un nivel similar al de las células cultivadas en DMEM¹⁹³. Así, nuestros experimentos, revelan que la PD máxima tanto para las hAMSC como para las FP-MSC derivadas de ellas es muy similar y que los dos tipos celulares tienen, independientemente del medio de cultivo un crecimiento finito; después de un período de expansión *in vitro*, inversamente proporcional a su velocidad de replicación, entran en una fase estacionaria de típica de senescencia, que se caracteriza por la expresión de β -Galactosidasa.

Una propiedad de las células con aplicación terapéutica debe ser su capacidad de diferenciación a otros tipos celulares. Por ello fue importante establecer que las FP-MSC crecidas en EGM-2, que presentan una clara diferencia morfológica y funcional con las hAMSC, mantienen la capacidad de diferenciación y siguen siendo multipotentes. Nuestros resultados muestran que el crecimiento en EGM-2 no afecta la capacidad de diferenciación y tanto a pase temprano como a pase tardío, las FP-MSC se pueden diferenciar a linajes tales como el osteogénico o el adipogénico. El medio de cultivo también puede influir en la expresión de los marcadores de superficie. Por ello, se analizaron un conjunto de marcadores característicos de diferentes tipos

celulares. La expresión de los marcadores que definen a las MSC (CD105, CD73 y CD90, y ausencia de CD34)⁴⁸ se mantienen en las FP-MSC pero en una proporción significativamente menor. También se analizaron otros marcadores de mesenquimales genéricos y específicos de tejido adiposo, y se encontró que aunque las FP-MSC, son positivas para los mismos marcadores que las hAMSC, salvo para el CD106 ausente en hAMSC, la proporción en que se expresa la mayoría de ellos es diferente, generalmente inferior. Muchos de los marcadores estudiados son también marcadores de células endoteliales, dado que el medio EGM-2 es un medio empleado en la diferenciación a células endoteliales, es lógico pensar que dichas moléculas de superficie se vean modificada por el cambio de medio. Se observó un incremento en el porcentaje de CD106 y CD49d y una disminución en CD54 y CD105 en FP-MSC con respecto las hAMSC. También se analizaron marcadores propios del linaje endotelial tales como son: CD31, VEGFR2 y CD144, de los cuales ninguno fue expresado por las FP-MSC. La *vascular cell adhesion molecule* o CD106, se expresa principalmente en células endoteliales, está implicada en la regulación de la migración de los leucocitos a través de la pared de los vasos sanguíneos y provee puntos de anclaje para el desarrollo de endotelio durante la angiogénesis^{194,195,196}. La expresión media de este marcador es nula en hAMSC y en FP-MSC está comprendida entre el 11,9% y el 20,2% en FP-MSC a pase temprano y tardío respectivamente, lo que supone un pequeño incremento relacionado posiblemente al tiempo de exposición a EGM-2. CD49d o VLA-4 α (*Very-late antigen 4*) es un miembro de la familia de las integrinas relacionado con la adhesión celular. Puede actuar como receptor de matriz y unirse a un dominio concreto de la fibronectina^{197,198}, o como receptor celular y unirse al CD106^{198,199}. La interacción entre el CD49d y el CD106 juega un importante papel estabilizando la adhesión de los linfocitos a las células endoteliales¹⁹⁹ y mediando la adhesión de los precursores de linfocitos B a las células estromales de la médula ósea. Su expresión media pasa de 25.4% en hAMSC, a 57.6 y 61.2% en FP-MSC de pase temprano y tardío respectivamente, duplicándose la expresión basal de las hAMSC. Este aumento puede deberse tanto al cambio de medio a EGM-2 como por cobertura de fibronectina de las superficies donde fueron crecidas estas

células. También se estudió la expresión media del CD133 y c-Kit, marcadores de células progenitoras. Ambos marcadores se encontraron ausentes en hAMSC, pero presentes en una proporción baja en FP-MSC. En el caso concreto del CD133 de pase temprano, la proporción media positiva fue significativamente superior a la de las hAMSC. Esta molécula se expresa en células progenitoras hematopoyéticas, endoteliales y gliales entre otros tipos celulares^{200,201}. Aunque es un buen marcador de células progenitoras, se desconoce cual puede ser la implicación funcional en las FP-MSC²⁰¹.

Para la aplicación clínica es indispensable que las células cumplan con el requisito de ser un agente terapéutico seguro. De forma indirecta, la entrada en senescencia sugiere que estas células no han sufrido ningún proceso de transformación neoplásica, y de hecho algunos trabajos relacionan la entrada en senescencia a un mecanismo de seguridad que protege del desarrollo de tumores²⁰². Las células mesenquimales humanas expandidas a gran escala *in vitro*, para su uso clínico, presentan baja susceptibilidad de transformación neoplásica⁹⁰. Sin embargo diversos trabajos indican que los periodos prolongados de cultivo pueden resultar en la generación espontánea de aberraciones cromosómicas^{88,89,90}, y llegar a formar carcinomas en ratones inmunosuprimidos²⁰³, aunque también podemos encontrar en la literatura, casos donde el proceso de transformación se ha debido a contaminación cruzada con células tumorales y/o a otros artefactos^{93,94,95,96}. Sin embargo, otros estudios demuestran que las MSC con y sin aberraciones, pueden ser inoculadas en ratones inmunodeprimidos o incluso en pacientes (transplante alogénico), y no desarrollar ningún tipo de tumor, después de un seguimiento de 8 semanas (ratón) y 2 años (pacientes) (R78). En nuestro caso, las FP-MSC y hAMSC fueron analizadas por Hibridación Comparativa de Genoma (CGH) para conocer si hubo algún tipo de ganancia o pérdida cromosómica asociada a la ventaja de crecimiento *in vitro*. No se detectó ningún tipo de cambio genómico significativo con respecto a las hAMSC parentales (PD medio ~10), tanto a pase temprano (PD medio ~9) como tardío (PD medio ~18), coincidiendo con los trabajos que defienden la estabilidad genómica en las mesenquimales⁸⁷. Cabe apuntar, que mientras dos de las muestras empleadas presentaron un cariotipo normal, una tercera tuvo una trisomía del cromosoma

21, que pudimos demostrar que era pre-existente en las hAMSC de origen y que se mantuvo en las FP-MSC. Aunque tanto la entrada en senescencia como la estabilidad genómica se pueden considerar como buenos indicadores de que estas células son seguras, consideramos prudente profundizar en este punto, dada su relevancia en las aplicaciones clínicas verificando que las FP-MSC de ninguno de los pacientes, crecidas *in vitro* tanto a fases tempranas como tardías eran capaces de formar tumores en ratones inmunosuprimidos. En estos experimentos, utilizamos un gen de luciferasa como trazador, que nos permitió monitorizar por imágenes de bioluminiscencia no invasiva el comportamiento de las células durante un periodo de más de 22 semanas (160 días). Aunque en este tiempo, sólo una fracción de las células implantadas fue capaz de sobrevivir más allá del día 25 post-inoculación, no hubo indicación alguna de proliferación celular excesiva ni de generación de tumor, corroborando de nuevo la seguridad de estas células.

Las características especiales de las FP-MSC sugieren cambios específicos en la expresión génica que podrían utilizarse no solo para comprender sus propiedades sino también para establecer un patrón característico que nos sirviese en el futuro como control de calidad.

Para ello continuamos la caracterización de las FP-MSC examinando las diferencias a nivel de expresión génica con las hAMSC, mediante análisis de microarrays. La aplicación del programa IPA a la colección de genes diferencialmente expresados entre ambos tipos celulares revela que las dos redes biológicas de mayor puntuación encontradas están relacionadas con propiedades ya detectadas e interesantes para la terapia celular, a saber: “Proliferación y Crecimiento Celular, Morfología Celular, y Muerte Celular” (Network 1: puntuación 82) y “Movimiento Celular, Señalización e Interacción Célula-a-Célula, Desarrollo Celular” (Network 2: puntuación 34). En ambas redes, se registra una predominancia de moléculas reguladas al alza en las FP-MSC. Aunque no podemos determinar si está contribución favorece o desfavorece dichas funciones sólo con los datos de expresión génica, si sabemos que las FP-MSC proliferan mucho más rápido que las hAMSC en condiciones de cultivo *in vitro*. Basándonos en los resultados de las dos redes

de mayor puntuación, se seleccionó una lista de 12 genes, de acuerdo a los niveles de mayor expresión y a las funciones biológicas asignadas por el IPA (“Proliferación y Crecimiento Celular” p-valor $<0,05$ y/o “Movimiento Celular” p-valor $<0,05$). Estos 12 genes fueron validados por RT-PCR en los dos tipos celulares (FP-MSC y hAMSC), para todos los pacientes, y en una pareja extra de FP-MSC y hAMSC de un paciente nuevo. Este estudio confirmó en todos los casos, la existencia de un patrón de cambio significativo en la expresión de la mayoría de estos genes, entre las hAMSC y las FP-MSC. Esto nos permite definir un grupo de genes que constituyen un perfil para caracterizar el fenotipo FP-MSC en el medio EGM-2.

El fenotipo FP-MSC es un fenómeno reproducible y característico de las hAMSC como población. Sin embargo, debido a que la población mesenquimal es heterogénea, decidimos estudiar el efecto del medio EGM-2 a nivel celular y determinar si todas las células tienen capacidad para responder del mismo modo al cambio de medio. Para ello, clones de células aisladas de un único paciente, fueron expuestos a ambos medios. Esta estrategia nos permitió eliminar variables como la diversidad genética de la población y/o de los pacientes. El 30% de las colonias generadas pudieron ser expandidas por más de 15 PD en ambas condiciones. El tiempo de duplicación medio de los clones en los dos medios, fue significativamente diferente: 1.79 días en EGM-2 frente a los 3.74 días en DMEM, valores similares a los que hemos ido encontrando en las células de los diferentes pacientes. Sin embargo, el PD máximo, fue una característica de cada clon e independiente del medio de cultivo.

Verificamos la adquisición del fenotipo FP-MSC a nivel celular analizando la expresión de los 12 genes inducidos característicos de las FP-MSC mediante RT-PCR, en 3 parejas de clones representativas. El cambio de expresión para cada clon crecido en EGM-2 con respecto a su “hermano” crecido en DMEM muestra mayoritariamente, una activación de la colección de los genes del perfil FP-MSC, independientemente de su PD máximo. Si comparamos estadísticamente, el comportamiento a nivel de expresión génica de estos tres clones con el de las cuatro poblaciones de los pacientes estudiados, resulta que para todos los genes, $p>0.05$, indicando que los FC no se pueden

considerar estadísticamente diferentes. En otras palabras, tanto si comparamos las colonias hermanas crecidas en DMEM o EGM-2, cuyo fondo genético es idéntico y la principal variable es el medio de cultivo; como si comparamos poblaciones heterogéneas derivadas de 4 pacientes diferentes, obtenemos un patrón similar en los cambios de expresión de esa lista de genes concreta. Por lo que estos resultados apoyan la hipótesis que el medio EGM-2 induce el fenotipo FP-MSC tanto a nivel poblacional como a nivel celular.

La inducción al fenotipo FP-MSC se repite consistentemente, podría ser interesante conocer si este proceso es irreversible, o si depende del medio de cultivo. Para determinar si se puede revertir al fenotipo hAMSC, se intercambiaron las condiciones de cultivo tanto en las células derivadas de un paciente como las de uno de los clones, y se analizó la expresión de los 12 genes del perfil FP-MSC.

Nuestros resultados demostraron que el fenotipo FP-MSC está íntimamente ligado al medio EGM-2 y es una propiedad reversible. Es decir, si las células FP-MSC se cultivan en el medio de las células mesenquimales (DMEM), las células tornan a la apariencia y velocidad de crecimiento característicos de las hAMSC, y por otro lado, los niveles de expresión de los doce genes del “perfil” estudiados disminuyen, haciéndose más similares a los de las hAMSC. Para el caso del paciente analizado, se observó una clara bajada del FC para todos los genes al cabo de sólo una semana de intercambio de medio, que se mantuvo durante la segunda semana. En el clon FP-MSC estudiado, el FC para cada gen mostró una tendencia a disminuir con el tiempo, aunque nunca se alcanzó el nivel basal observado en las hAMSC. Posiblemente el hecho de haber elegido el clon con mayor potencial proliferativo haya influido en los resultados obtenidos.

Gracias a esta plasticidad celular, podríamos obtener grandes cantidades de células en un periodo corto de tiempo, y podríamos elegir si queremos trabajar con células tipo hAMSC o FP-MSC.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Las FP-MSC además de por su similitud con ciertas propiedades de las hAMSC y su ventaja de crecimiento *in vitro*, presentaron dos resultados en nuestro análisis, la expresión de genes asociados a los procesos de reparación y anti-inflamatorios y una mayor capacidad angiogénica que sugirieron su potencial de las FP-MSC como agentes terapéuticos.

Tanto el tejido de origen de las células mesenquimales como las condiciones de cultivo, influyen en la expresión de los diferentes genes. De acuerdo con los resultados de un estudio reciente que compara la expresión diferencial entre las células mesenquimales de origen adiposo y las de la médula ósea las primeras secretan, cantidades significativamente, mayores de factores de crecimiento, pro-angiogénico, y citoquinas reguladoras de la inflamación y la coagulación. Estas moléculas podría favorecer el proceso de regeneración por efecto paracrino²⁰⁴, El hecho de que las FP-MSC de este estudio también se hayan inducido genes relacionados con la secreción de moléculas, como los factores de crecimiento: AREG/AREGB y HGF, y las citoquinas: TNFSF4, CXCL5, CCL20 de entre los cuales, CXCL5 y CCL20 coinciden con la referencia anteriormente comentada²⁰⁴, hace pensar que podrían presentar cierta ventaja a nivel terapéutico debido al efecto paracrino de dichas moléculas.

Por otra parte, aunque el medio EGM-2 se suele usar para inducir la diferenciación de células al linaje endotelial, en nuestro análisis de expresión génica no encontramos que el cultivo en este medio hubiese inducido genes específicos asociados al linaje endotelial¹⁸⁵. A pesar de esto, nuestro análisis funcional utilizando Matrigel para promocionar la formación de estructuras de tipo vascular indicó que las células crecidas en EGM-2 son capaces de desarrollar estructuras tubulogénicas no sólo en una cantidad significativamente mayor, sino también mejor organizadas y más estables en el tiempo, que las hAMSC de las que provienen. Este resultado pone de manifiesto la necesidad de complementar los análisis de expresión génica con ensayos funcionales para la caracterización celular

Diversos trabajos respaldan el uso de las hAMSC como vehículos terapéuticos contra los tumores. Se ha observado que existe una interacción dinámica entre las células mesenquimales y las células tumorales, *in vitro*, y que las MSC son capaces de migrar hacia los tumores en los que se establecen y sobreviven *in vivo*²⁰⁵. Además de compartir propiedades similares con las MSC, las FP-MSC se pueden expandir rápidamente así como generar estructuras tubulogénicas, que *a priori*, podrían favorecer un procedimiento terapéutico.

Se decidió explorar la posibilidad de que estas células pudiesen aportar ventajas como vehículos para la expresión de agentes citotóxicos en un modelo de terapia anti-tumoral. Para ello modificaron genéticamente las FP-MSC con el gen de la timidina kinasa del herpes como agente citotóxico en un modelo de glioma en ratones SCID, procedimiento que ya había demostrado eficacia en nuestro laboratorio^{206,207}. El análisis comparativo del tratamiento del tumor con ambos tipos celulares, confirmó la eficacia de las hAMSC en el tratamiento anti-tumoral, reduciendo en un 93% el tamaño de los tumores en comparación con controles no tratados. Sin embargo, en el caso de las FP-MSC no se detectaron efectos citotóxicos y contrariamente a lo que cabía esperar, los tumores aumentaron 32.4 veces con respecto a los controles U87 no tratados. Según los datos recogidos en los microarrays, las FP-MSC tienen una mayor capacidad de expresión para una serie de genes entre los que podemos encontrar varios factores de crecimiento (AREG/AREGB Y HGF) y diversas citoquinas (TNFSF4, CXCL5 y CCL20) que han demostrado promover el avance de los tumores, incluso a nivel metastático^{208,209,210}. Por consiguiente, podríamos plantear como hipótesis que las FP-MSC promueven el crecimiento tumoral mediante la acción, directa o indirecta, de algunas de las moléculas mencionadas anteriormente^{209,210,211,212}, quedando el efecto citotóxico enmascarado por su potente efecto pro-cancerígeno.

Una explicación alternativa podría ser la falta de uniones intercelulares (gap junctions) entre las células tumorales y sus vecinas, lo que reduciría la eficacia del efecto bystander base de la estrategia terapéutica.

Para comprobar esta segunda hipótesis, utilizamos un modelo de tumores de próstata PC3 ectópicamente implantado en muslos de ratón SCID, más accesible y con la posibilidad de tener en un mismo animal el control negativo (tumores solos). Además decidimos utilizar como sistema citotóxico CD-UPRT, la combinación citosina desaminasa y uracilo foforiltransferasa genéticamente introducidas en las FP-MSC ya que la actividad citotóxica de este sistema no depende de la existencia de “gap-junctions” entre las células tumorales y FP-MSC. . A pesar de estos cambios, el efecto citotóxico de la CD-UPRT quedó oculto bajo el dominante efecto pro-carcinogénico de estas células, que aumentó en más de mil veces el tamaño del tumor con respecto al control PC3 solas. En consecuencia concluimos que el efecto pro-carcinogénico de las FP-MSC prevalece por encima del efecto citotóxico de cualquiera de estos dos genes suicidas empleados, independientemente de las uniones celulares que pueda establecer o no las FP-MSC.

La capacidad promotora del crecimiento de las FP-MSC sugirió una utilización alternativa en terapias de regeneración de tejidos, en concreto la regeneración de tejido cardíaco.

Estudios independientes de diferentes laboratorios han demostrado que la administración de células mesenquimales de tejido adiposo puede actuar favorablemente en la revascularización de tejidos isquémicos^{213,214,215}, y mejorar la función del ventrículo izquierdo en modelos animales de infarto miocárdico agudo y crónico^{216,217}. Se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales las hAMSC podrían tener tales efectos: (1) la diferenciación de las propias células a cardiomiocitos²¹⁸, a células del músculo liso o células endoteliales²¹⁴; (2) secreción de citoquinas y factores de crecimiento, como el VEGF o el HGF, con capacidad de inducir la diferenciación endotelial, la migración y la formación de vasos^{219,220,221}; (3) la atenuación de la inflamación en la zona dañada mediante funciones inmunosupresivas^{222,223}; (4) la estimulación de la reparación endógena^{224,225}.

Para valorar la capacidad reparadora de las FP-MSC, decidimos compararlas con las hAMSC, en un modelo de isquemia cardíaca en ratón SCID, basado en

el uso de parches de fibrina como soporte. Debido a que en estos estudios nos interesaba analizar la capacidad de diferenciación de las células terapéuticas, éstas se marcaron para la expresión de dos trazadores de bioluminiscencia uno de ellos de expresión continua y el otro regulado por promotores de genes que se inducen durante la diferenciación a los linajes cardiomiocíticos y endoteliales. Con esta estrategia se podrían seguir los cambios en la expresión génica de las células de modo no invasivo, en animales vivos. Es más, la relación entre la luz emitida por la luciferasa regulada por el promotor específico y la luz emitida por la luciferasa expresada de modo constitutivo, nos permitiría conocer como variaba la expresión de estos genes independientemente de los cambios en el número de células. Nuestros resultados indicaron que a) se podía observar el proceso de diferenciación de los dos tipos celulares, b) que las FP-MSC y MSC son equivalentes en su capacidad de diferenciación endotelial, c) que los dos tipos celulares tienen equivalente potencial de diferenciación al linaje cardiomiocítico. En conclusión, debido a la mayor capacidad de proliferación de las FP-MSC, estas serían el mejor candidato como agentes en la terapia celular del miocardio.

Los datos obtenidos por BLI fueron corroborados independientemente mediante análisis inmunohistoquímico que demostró la expresión de los genes PECAM1 y Troponina, y la presencia de dichas proteínas en las células implantadas.

El análisis histológico de la densidad vascular en aquellos ratones que han sido tratados con célula, tanto hAMSC como FP-MSC, demostró incrementos significativos del $137.70 \pm 28.21\%$ y $159.05 \pm 39.48\%$ respectivamente, comparados con los controles sin parche ($40.11 \pm 8.61\%$) y para los parches de fibrina sin células ($76.44 \pm 21.58\%$). La mejora en la densidad vascular puede venir tanto por diferenciación de las células implantadas como por efecto paracrino de las mismas. A pesar de estar bien documentada la capacidad de diferenciación de estas células^{214,218}, ciertos investigadores especulan que la principal contribución de estas células es mediada a través de los factores de crecimiento y citoquinas que secretan²¹⁸. El HGF es un factor de crecimiento relacionado con diversos efectos en los procesos de regeneración de tejidos:

efecto anti-apoptótico, inmunomodulador y mejora de la cicatriz⁹⁹. Esta molécula se expresa en las hAMSC, pero en las FP-MSC se expresan de media 5,6 veces más según los datos del microarray, y 75,7 veces más según la validación por RT-PCR. Este aumento en la expresión en ésta y otras moléculas de secreción, puede jugar un papel importante en el desarrollo de una terapia regenerativa. El análisis morfométrico, de la fracción de área de tejido fibrótico, respecto al área total del ventrículo, muestra que los corazones que recibieron el trasplante celular, tienen de media una cicatriz superior al de los grupos controles, aunque las diferencias no fueron significativas. Estos valores nos permiten conocer el tamaño de la cicatriz en el momento de finalización del experimento, sin embargo, no nos permiten saber cómo ha evolucionado cada grupo durante el periodo de tratamiento. Debido a que aunque la inducción del infarto se haga de forma sistemática, no todos tienen el mismo grado de isquémica, por ello es preferible trabajar con un sistema de análisis que nos permita seguir a los ratones durante todo el periodo de estudio. La función cardíaca se puede valorar a partir de la fracción de eyección (FE), que a su vez, se puede calcular en base a los registros ecocardiográficos tomados a diferentes tiempos. En nuestros experimentos, la diferencia entre los datos basales y los valores post-infarto, nos sirvió para calcular el decremento de FE post-infarto, y la diferencia entre los datos pre-sacrificio y los valores post-infarto nos indican el grado de recuperación de FE para cada grupo. El decremento post-infarto varió entre los diferentes grupos, lo que refleja la variabilidad en la generación de las isquemias. Pudimos observar que los animales tratados con Fibrina y con Fibrina+FP-MSC, presentan los valores más altos de mejora respecto al grupo control MI, 18.40 y 17.48% respectivamente. Los ratones tratados con Fibrina+hAMSC presentaron un valor medio de mejora ligeramente superior al del control MI sin Fibrina (10.31 frente a los 8.96%). Como en el caso del análisis de vascularización, la fibrina por sí sola parece tener un efecto positivo detectable, superior al propio efecto de las hAMSC. El mecanismo responsable del efecto terapéutico de la fibrina se desconoce. Sin embargo, es posible que esté relacionado con el mecanismo que promueve la cicatrización de las heridas, donde actúa como matriz natural para la angiogénesis. Algunos trabajos han demostrado el potencial como

inductor angiogénico de la fibrina tanto en implantes exógenos subcutáneos²²⁶ como en ensayos en membrana corioalantoide de pollo²²⁷, además de su capacidad como reservorio de varios factores de crecimiento²²⁸ y enzimas fibrinolíticas²²⁹. Aunque el fenómeno de que la fibrina sola es superior a las hAMSC para la recuperación de la FE es una observación repetida en trabajos similares en nuestro laboratorio, todavía queda por esclarecer el mecanismo subyacente.

Una posible explicación podría ser que la fibrina y las células FP-MSC tiene un efecto positivo en la recuperación de la FE por mecanismos diferentes y que las hAMSC inhiben el mecanismo de la fibrina sin aportar un efecto positivo propio. Estas hipótesis abren nuevas líneas de trabajo, que podrían focalizarse en la investigación de estos procesos.

Este trabajo recoge una extensa caracterización de las FP-MSC, hAMSC crecidas en EGM-2, que incluye estudios a nivel de proliferación *in vitro*, parámetros relacionados con las propiedades mesenquimaloides, perfil genético y bioseguridad. Los datos recogidos de la experimentación *in vitro*, apuntan a estas células como una alternativa en el uso de hAMSC en terapias celulares, dada las ventajas anteriormente detalladas. Las FP-MSC fueron probadas en dos tipos de terapias: anti-tumoral y regenerativa. La terapia anti-tumoral mediada por las FP-MSC portadoras de un gen suicida, no produjo ninguna mejora con respecto a las hAMSC crecidas en su medio estándar. Sin embargo, en el ámbito de la regeneración cardiaca, las FP-MSC mostraron una leve mejora con respecto a las hAMSC. Ambos tipos celulares fueron capaces de diferenciarse al linaje endotelial y miocárdico, sin embargo, a nivel de función cardiaca las FP-MSC tiende a presentar ciertas mejoras en lo que se refiere a densidad vascular y FE en comparación con las hAMSC. Si a esto, le sumados sus características de crecimiento en EGM-2 y *capacidad vasculogénica*, parecería que estas células podrían ser una interesante y novedosa opción para el tratamiento de la isquemia cardiaca.

Aún queda bastante por profundizar en el estudio de estas células, como por ejemplo en lo referente al campo de los efectos paracrinos. Pero podemos

DISCUSIÓN

decir que se abre un amplio campo en el ámbito de la terapia celular donde poder aplicarlas, ya que podemos obtener grandes cantidades de células autólogas para tratamientos terapéuticos en un periodo de tiempo breve; pudiéndolas utilizar como sustitutas de las hAMSC u otro tipo de mesenquimal, o en combinación con otro tipo celular para tener un efecto sinérgico, y mejora el resultado terapéutico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

- El cultivo de las células mesenquimales de tejido adiposo en medio EGM-2 resulta en una población de células fenotípicamente diferentes que denominamos FP-MSC en este estudio.
- Las células FP-MSC se parecen, pero no son idénticas a las hAMSC en la expresión de marcadores de superficie y capacidad de diferenciación.
- La capacidad de replicación de las FP-MSC es del orden de 4,4 veces superior al de las hAMSC, aunque los dos tipos celulares se replican un número finito y similar de veces antes de llegar a la senescencia.
- Las FP-MSC expandidas *in vitro* son seguras, no muestran aberraciones cromosómicas y no producen tumores cuando se implantan en ratones inmunodeprimidos durante largo tiempo.
- La comparación de la expresión génica entre FP-MSC y hAMSC ha puesto de manifiesto un patrón de expresión para una variedad de genes que se pueden utilizar para caracterizarlas.
- Las FP-MSC se generan por inducción de cambios en la expresión génica y no son el resultado de la selección de una subpoblación presente entre las hAMSC.

Los estudios de aplicabilidad a terapéutica indican que:

- Las FP-MSC no se comportaron como buenos vehículos terapéuticos en terapias anti-tumorales, ya que promocionan el crecimiento tumoral más que el efecto citotóxico.
- Las FP-MSC tienen mayor potencial angiogénico que las hAMSC, en Matrigel, produjeron más estructuras tubulares, mejor organizadas y más estables que las hAMSC.

CONCLUSIONES

- Las FP-MSC implantadas en miocardios infartados se diferenciaron al los linajes endoteleiales y cardiomiocíticos con una eficacia similar a la de las MSC.
- Los miocardios infartados tratados con FP-MSC indujeron mejoras significativas en la revascularización del miocardio infartado.
- La observación de que los miocardios infartados tratados con FP-MSC tuvieron mejoras en la fracción de eyección superiores a las de las hAMSC, aunque no mejores que las producidas por la fibrina sola, sugiere que las FP-MSC generan efectos paracrinos diferentes a los de la fibrina, ambos participantes en la reparación del miocardio.

CONCLUSIÓN GENERAL:

- I. Las células FP-MSC son agentes terapéuticos prometedores.
- II. Debido a su rápido crecimiento *in vitro* las FP-MSC permiten generar grandes cantidades de células seguras y con potencial para promocionar la reparación del miocardio infartado.
- III. Es posible que una exploración más extensa permita demostrar una aplicabilidad más amplia de estas células en el ámbito de la terapia celular.

APÉNDICE

DESCRIPCIÓN DE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE ANALIZADOS

Marcador	MSC	Marcador	MSC
CD4	-ve	CD73 (SH3 and SH4)	+ve
CD9	+ve	CD81	nd
CD10	+ve	CD90	+ve
CD11a	-ve	CD102	+ve
CD13	+ve	CD103	nd
CD14	-ve	CD104	+ve
CD15	-ve	CD105 (SH2)	+ve
CD18	-ve	CD106	+ve
CD25	-ve	CD109	nd
CD29	+ve	CD113	nd
CD31	-ve	CD117	-ve
CD34	-ve	CD119	+ve
CD36	nd	CD120a	+ve
CD38	nd	CD120b	+ve
CD44	+ve	CD121	+ve
CD45	-ve	CD122	nd
CD49a	+ve	CD123	+ve
CD49b	+ve	CD124	+ve
CD49c	+ve	CD126	+ve
CD49d	-ve	CD127	+ve
CD49e	+ve	CD140a	+ve
CD50	-ve	CD164	nd
CD51	+ve	CD166	+ve
CD54	+ve	HLA class 1	+ve
CD56	nd	HLA-DR	-ve
CD58	+ve	LNGFR	+ve
CD61	+ve	H1P12	nd
CD62e	-ve	Beta 2 microglobulin	nd
CD62L	+ve	KDR	nd
CD62p	-ve	Flt1	nd
CD63	nd	Fibroblast surface antigen	nd
CD71	+ve		

Tabla 12: Expresión de varios marcadores de superficie en MSC. +ve, positivas; -ve, negativas, nd, no descrita. (Adaptada de Wagey R., 2008).

- **CD105**

Es una glicoproteína homodímera de 180KDa localizada en la superficie celular. Forma parte del complejo receptor TGF- β 1 (*transforming growth factor beta*) implicado en la proliferación celular, la diferenciación y la migración, a pesar de que sus funciones en la interacción receptor-ligando aún son poco conocidas^{230,231}. Se expresa principalmente en células endoteliales y también en células madre mesenquimales.

- **CD90**

También conocida como Thy-1 debido a su identificación en timocitos, es una proteína de 25KDa muy conservada en vertebrados. Su expresión varía según la especie, pero generalmente se expresa en timocitos, neuronas, células madre mesenquimales y hematopoyéticas, células NK, endotelio y en una fracción de fibroblastos; en humanos, sólo se expresa en neuronas²³² y en algunos tipos de célula madre^{233,234}. Su función no se conoce exactamente, pero se especula que podría participar en las interacciones célula-célula y célula-matriz, y participar en la regeneración nerviosa, apoptosis, supresión de tumores²³⁵, metástasis, inflamación y fibrosis.

- **CD73**

Es una enzima unida a la cara externa de la membrana, formada por un dímero de 2 subunidades idénticas de 70KDa. Cataliza la conversión de 5'-mononucleótidos a nucleósidos a pH neutro. Se expresan en una fracción de células B, células T, células endoteliales, pericitos, células dendríticas, epiteliales, fibroblastos, cardiomiocitos, neuronas, osteoblastos, oligodendrocitos, y células madre mesenquimales²³⁶. Su función puede estar relacionada con la permeabilidad de las células endoteliales, la secreción de cloruro por las células endoteliales o la adhesión de neutrófilos, aunque puede presentar funciones independiente a su actividad enzimática, transmitiendo una potente señal de activación en las células T cuando se unen a los anticuerpos.

- **CD34**

Es una proteína transmembrana altamente glicosilada de 385 aminoácidos. Está presente en células madre linfohematopoyéticas, células endoteliales de pequeños vasos, fibroblastos embrionarios y en algunas células de tejido nervioso fetal y adulto²³⁷. Participa en la unión entre las células madre y la matriz extracelular de la médula ósea o directamente con las células estromales²³⁸, posiblemente manteniendo el fenotipo de célula progenitora/madre hematopoyética.

- **CD13**

Es una glicoproteína N aminopeptidasa tipo II de membrana de 150KDa. Podemos encontrarlo en granulocitos y monocitos, y sus precursores; aunque también podemos encontrarlo en células no-hematopoyéticas como las células endoteliales, epiteliales, en ciertas áreas renales, fibroblastos, células del cerebro, mesenquimales y células de los canalículos biliares. CD13 es una metaloproteasa de unión al zinc implicada en el metabolismo de regulación de numerosos péptidos.

- **CD29**

Son cadenas Integrina beta de 130KDa que se expresan como un heterodímero. Se asocia de manera no covalente con cadenas alfa específica de la familia CD49 (CD49a-f). Los miembros de la familia de las integrinas son receptores de membrana implicados en adhesión celular y reconocimiento de señales en diversos procesos como la embriogénesis, la hemostasis, la reparación tisular, la respuesta inmune y la difusión metastásica de células tumorales. El CD29 se expresa en leucocitos en reposo y activados²³⁹.

- **CD44**

Es una glicoproteína transmembrana tipo I que tiene entre 80 y 250KDa. CD44 es la principal molécula de adhesión para el ácido hialurónico²⁴⁰, además es un importante mediador en regular la interacción entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina. CD44 se expresa en la mayoría de tipos celulares humanas, y está implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, tales como el reclutamiento de linfocitos y su activación, la cicatrización, la migración celular y también el crecimiento de células tumorales y metástasis²⁴¹.

- **CD49d**

También conocida como integrina $\alpha 4$ o *very-late antigen* (VLA)-4 es una glicoproteína implicada en la adhesión celular de 150KDa. Se asocian con otra glicoproteína, la subunidad β , para formar un heterodimero implicado en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. La cadena β del complejo VLA-4 es el CD29. Cuando actúa como receptor de la matriz, el CD49d se une a un dominio concreto de la fibronectina^{242,243}. Cuando funciona como receptor celular, se une al CD106^{126,244}. La interacción entre el CD49d y el CD106 juega un importante papel estabilizando la adhesión de los linfocitos a las células endoteliales¹²⁷ y mediando la adhesión de los precursores de linfocitos B a las células estromales de la médula ósea. También proporciona co-estimulación de los receptores de células T mediados por CD3. CD49d es expresado en un amplio rango de células, incluyendo linfocitos T, células B, monocitos, eosinófilos y basófilos, en células mesenquimales podemos encontrarlo en células de origen adiposo pero no en las que proceden de la médula ósea.

- **CD54**

También conocida como molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1), es una glicoproteína de superficie celular que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina de moléculas de adhesión. Tiene un papel muy importante en la estabilización en las interacciones célula-célula y facilitan a los leucocitos la trans migración endotelial. Su expresión es baja en leucocitos, células epiteliales y células endoteliales, al igual que en otros tipos celulares, pero su expresión puede ser estimulada por el IFN-gamma, TNF-alfa, Interleucina-1 beta y LPS

- **CD106**

La *vascular cell adhesion molecule-1* o CD106 es una glicoproteína transmembrana tipo I de unos 110KDa. Está implicada de manera crítica en las interacciones endoteliales de tejido conectivo^{245,246}. CD106 se expresa

constitutivamente en las células estromales de la médula ósea, células mieloides, y células dendríticas esplénicas. Su expresión en células endoteliales está inducida por citoquinas inflamatorias producida por tejidos inflamados^{247,248,249}. En general, estas moléculas regulan la migración de leucocitos a través de las paredes de los vasos sanguíneos y proveen de puntos de anclaje para el desarrollo de endotelio durante la angiogenesis^{250,251,252}.

- **CD133**

Es una glicoproteína transmembrana que se localiza específicamente en las protusiones celulares. Se expresa en células madre hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales, células madre de la glia y neuronal, y además en tejidos adulto como el riñón, glándulas mamarias, tráquea, glándulas salivares, o placenta entre otros tipos celulares^{253,254}. A pesar de ser un buen marcador de células madre se desconoce si tiene algún papel en sus características funcionales²⁵⁴.

- **CD31**

También denominada como PECAM-1(*platelet endothelial cell adhesion molecule*) tiene un papel clave en la eliminación de neutrófilos viejos del organismo. Se expresa en gran cantidad en células endoteliales, pero también en plaquetas, macrófagos, fibroblastos y osteoclastos entre otros. CD31 participa en las uniones célula-células, en la migración trans-endotelial de los neutrófilos y está implicado en la angiogénesis^{255,256}.

- **VEGFR2**

Es una proteína tirosina-quinas que actúa como receptor de superficie celular, y tiene unas 150KDa. Tiene un papel esencial en la regulación de la angiogénesis, el desarrollo vascular, la permeabilidad vascular y la hematopoyesis embrionaria. Promueve la proliferación, supervivencia,

migración y diferenciación de las células endoteliales. Está implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina.

- **CD144**

CD144 o VE-caderina pertenece a una familia de moléculas de adhesión. La células endoteliales expresan como mínimo tres tipos de caderinas, entre las cuales la VE-caderina se expresa de manera específica en las uniones entre las células endoteliales²⁵⁷. Parece ser que son importantes en el mantenimiento de la permeabilidad endotelial, y por tanto se cree que también en el control de la trans migración^{257,258}. CD144 también regula diversos procesos como la proliferación celular y la apoptosis, y también modula las funciones del receptor VEGF²⁵⁹.

- **c-Kit**

También conocida como CD117 o *stem cell factor receptor* (SCFR), es el receptor del factor de crecimiento *stem cell factor* (SCF). Es un receptor transmembrana con actividad tiosina quinasa. Se expresa principalmente en células madre hematopoyéticas y células progenitoras²⁶⁰, en células de leucemia mieloide aguda²⁶¹, en mastocitos²⁶² y en melanocitos, sistema reproductivo y cerebro embrionario²⁶³.



AGRADECIMIENTOS

Resumen

Para realizar una Tesis se requiere de ingredientes básicos como son la constancia, la paciencia y el entusiasmo, casi, en las mismas proporciones. Quien lo ha vivido, sabe que es un proceso largo y arduo, pero sobre todo, sabe que lo que realmente importa son las personas que nos rodean, con sus ánimos, su apoyo constante y su infinita paciencia. A todas esas personas que me han ayudado, y han estado a mi lado en los diferentes momentos, van dirigidas estas líneas. Gracias.

INTRODUCCIÓN

Mis compañeros de trabajo, me han enriquecido científica y personalmente, ofreciéndome incontables buenos momentos, apoyo y cercanía.

Lo primero de todo, quiero agradecerle a Jerónimo y Nuria haberme permitido realizar esta tesis en vuestro laboratorio. Habéis sabido transmitirme vuestros conocimientos e ilusiones por cada paso que hemos ido avanzando con las “monstruos”, siempre marcado por la calidad humana que os caracteriza. He aprendido con vosotros que “otra ciencia” es posible, permitiéndome crecer tanto a nivel personal como profesional.

Juli y María, más que compañeros, amigos. Os debo más que las gracias, por todos esos incontables buenos momentos (y algunos no tan buenos) llenos de risas e intelectuales conversaciones... que han forjado esta amistad. Juli, mi niño mierdaa! tengo que darte las gracias por tantas cosas que no sabría por donde empezar, sobretodo gracias por ser como eres, tan optimista y alegre, por escucharme y aconsejarme, y por ayudarme y orientarme en cada cosa que he necesitado. María porquería, gracias por todos esos cafés y

paquetes de Kleenex compartidos. Tu generosidad y espontaneidad te demarcan. Cada vez que he necesitado tu ayuda o simplemente desconectar, me lo has ofrecido sin reticencia, gracias! Estos últimos años han sido muy especiales para mí, y siempre los recordaré con mucho cariño, espero que de vez en cuando podamos quedar las tres marías: Caca, Mierda y Porquería para volver a compartir un buen “cafés-bombón”.

Olaia y Marta G., formáis parte de este grupo y por ello os agradezco los momentos que hemos compartido. Marta, ere el último fichaje, pero te has sabido ganar nuestro corazón en muy poco tiempo. De todas las cojas, de lejos, tu eres la mejor! Gracias de nuevo por tu ayuda como traductora.

Carol S., no formas parte del lab pero como si lo fueras! Tu ayuda me ha resultado inestimable, me has traído la luz, y no sólo la de la BLI!! Eres una excelente científica y una gran persona.

Del centro, agradecer a todos mis compañeros del ICC-CESGA esos pequeños y no tan pequeños momentos que hemos compartido, sus sonrisas, ayudas y ánimos

AGRADECIMIENTOS

recibidos. Quisiera destacar la ayuda, paciencia y consejos recibidos por Sandra C., en todo lo relacionado con el procesamiento de datos de los arrays y RT-PCR; gracias por salvarme del caos... A Esther P. y Javi C. por su asesoramiento, compañía y ayuda en sus respectivas plataformas. A Laura C. por aguantar las esperas entre ratón y ratón mientras hacíamos las ecos. A Pablo C. por su cercanía y su interminable lista de chiste. Y a Anna G. por su compañía, apoyo y suministro de frutos secos en la biblioteca.

RESULTADOS

De mi estancia en Barcelona, guardaré numerosos buenos recuerdos de muchísimas personas. Pero sobre todo, quiero darle las gracias a Ana Janic, Leire, Carme y Elisa por haber sido y ser grandes amigas.

Ana y Leire, si me dieran a elegir, volvería a empezar la aventura del doctorado en el laboratorio de Tano, por el simple hecho de volver a conocerlos. Ana, más que una amiga, casi una hermana! Desde que nos conocimos, conectamos, y desde entonces, no hemos parado de pasárnoslo bien. Me has transmitido toda la alegría que te caracteriza, has estado ahí para cualquier problema y siempre me has dado tu apoyo y tu amor. Te echo muchísimo de menos, espero que le saques el máximo partido a tu experiencia en Australia y que vuelvas muy pronto. Leire, mi vasquita, eres de ese tipo de personas que aunque no nos veamos con la frecuencia que quisiéramos sé que para cualquier cosa puedo contar contigo. Has sabido escucharme y consolarme en numerosas ocasiones, además de reírnos y

divertirnos en incontables situaciones. Tu hijo tendrá suerte de tener una madre como tú, te deseo todo lo mejor en esta nueva etapa que llega.

Carme y Elisa, mis “profes” de 293T! Habéis estado tanto en los buenos como en los malos momentos. Pero sin duda alguna, me quedo con todo esas horas de confesionario y risas que hemos compartido. Carmeluchi, desde que nos conocimos, como siempre tan hospitalaria, me abriste la puerta de tu “sala de cultivo”, y desde entonces, hemos compartido grandes momentos juntas. Tienes un corazón enorme, sé que al final te irá todo fenomenal, solo dale tiempo al tiempo. Elisa, *májica*, sabes escuchar a las personas y sacarles una sonrisa con tu optimismo y ese humor tan simpático que te caracteriza. Te echaré de menos cuando te vayas a Alemania, donde seguro, todo te irá muy bien, incluso hacer maletas!

MATERIALES Y MÉTODOS

No sería quien soy sin las personas que he ido conociendo a lo largo de mi vida.

De mi paso por la Facultad de Biología de Sevilla, puedo decir orgullosa que conservo grandes amistades. Patri, te haces querer por tu peculiaridades...! Sé que tengo una amiga al otro lado del teléfono, con la que puedo pasármelo en grande, discutir y pedir ayuda. Fernando, quién te va a querer a ti... te dije una vez, te acuerdas? Has sido un gran amigo, siempre cercano y muy alegre, y por supuesto, muy querido por mi y por muchísimas personas...! Sara, tipeja! Casi lo consigues y lees antes que yo... Me alegro que lo hayas conseguido, te lo mereces!

Sigue tan risueña y con la misma filosofía de vida, seguro que la vida también te sonreirá! MJ, siembre a su bola pero también preocupada por su gente, te deseo todo lo mejor en tu negocio y en tus planes de maternidad.

De forma muy especial, quiero agradecer a mis amigos de Puerto Real el simple hecho de ser como son. Ir a casa, además de los cuidados de mi madre significa para mí, relajarme, desconectar y recordar que la vida es para disfrutarla con aquellas personas que nos hacen sentir bien; y es que el *salero* que allí se respira y que inunda la forma de entender la vida no lo puedo compara con nada... Por eso, Kiki, Fernando, Perico, Paco, Inma, Raul, Almudena, Ana Quiros, Toñi, Isa, Pery y Perico M., gracias por todos los momentos compartidos, no sabéis cuanto han significado par mí.

DISCUSIÓN

Como dice una buena amiga, la familia es la que toca y no se puede cambiar. Y por suerte, no me hace falta cambiarla!

Quiero agradecer a la Familia García, su acogida y el haberme hecho sentir como una más de la familia, a pesar de ser la última en llegar. Pero sobre todo, quiero

agradecerle a Pati y Jordi, todo el cariño y atención recibida, sobre todo en estos últimos y duros meses donde no ha faltado un cubierto en vuestra mesa para invitarme a un buen caldo, y permitirme desahogarme.

A mi madre y a mi padre, darle las gracias por todo el amor y apoyo que me habéis dado, y por todo lo que habéis echo por mí. Sé lo mucho que os habéis sacrificado para que vuestros hijos pudiesen hacer aquello que ustedes no tuvisteis la oportunidad de hacer. Mamá, ahora por fin tienes una doctora en casa! Pero no me pidas que te cure nada...!

A mis hermanos, Esther, Enrique, Lucas Lalo y Mali, que os puedo decir!! Que os quiero muchísimo, y que lo que más me duele de vivir en Barcelona es teneros tan lejos. Esta tesis está dedicada a vosotros porque sois parte de mí y por todo el amor que me dais sin pedir nada a cambio.

Alex, estás el último pero sabes que eres el primero. Has sufrido los numerosísimos altibajos que he vivido en esta tesis y media, y has sabido animarme y motivarme para seguir adelante después de cada caída. Se quedan cortas estas líneas para darte las gracias por toda tu paciencia, todo tu amor y por la forma tan especial que tienes de hacerme reír. Te quiero.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 New York Organ Donor Network, Available at <http://www.donatelifeny.org/transplant/murray.html>.
- 2 Lysaght, M.J. & O'Loughlin, J.A., Demographic scope and economic magnitude of contemporary organ replacement therapies. *ASAIO J* 46 (5), 515-521 (2000).
- 3 Treasure, T., Davies, M.K., & Hollman, A., Stamps in cardiology. Artificial heart. *Heart* 92 (5), 584 (2006).
- 4 Hausmann, H., Siniawski, H., & Hetzer, R., Mitral valve reconstruction and replacement for ischemic mitral insufficiency: seven years' follow up. *J Heart Valve Dis* 8 (5), 536-542 (1999).
- 5 Radcliffe, C.W., The biomechanics of the Canadian-type hip-disarticulation prosthesis. *Artif Limbs* 4 (2), 29-38 (1957).
- 6 Friedman, R.M., Gyimesi, I., Robinson, J.B., Jr., & Rohrich, R.J., Saline made viscous with polyethylene glycol: a new alternate breast implant filler material. *Plast Reconstr Surg* 98 (7), 1208-1213; discussion 1214-1205 (1996).
- 7 Mimeault, M., Hauke, R. & Batra, S.K. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 82, 252-264 (2007)
- 8 Jacobsen, L.O., Marks, E.K., Gaston, E.O. & Zirkle, R.E. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med.* 34, 1538-1543 (1949).
- 9 Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R. & Shelton, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12, 197-201 (1951).
- 10 Web de la Sociedad Americana de Terapia Celular (ASGCT American Society of Gene & Cell Therapy): www.asgct.org
- 11 Chris Mason†, David A Brindley, Emily J Culme-Seymour & Natasha L Davie. Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential. *Regenerative Medicine* Vol. 6, No. 3, 265-272 (May 2011)
- 12 R. Lee Buckler , Opportunities in Regenerative Medicine , *BioProcess International*, Vol. 9, No. S1, March, pp. 14–19 (2011)
- 13 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).
- 14 Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M. & Gerson, S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176, 57-66 (1998).
- 15 Devine, S.M., Peter, S., Martin, B.J., Barry, F. & McIntosh, K.R. Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer J* 7 Suppl 2, S76-82 (2001).
- 16 Horner, P.J. & Gage, F.H., Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407 (6807), 963-970 (2000).
- 17 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391), 1145-1147 (1998).
- 18 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. Dec 21;318(5858):1917-20 (2007).

- 19 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. Nov 30;131(5):861-72 (2007).
- 20 Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, Huo H, Loh YH, Aryee MJ, Lensch MW, Li H, Collins JJ, Feinberg AP, Daley GQ. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. Nov 27;29(12):1117-9 (2011). Erratum in: *Nat Biotechnol*. Jan;30(1):112 (2012).
- 21 Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. May 13;474(7350):212-5 (2011).
- 22 Odorico, J.S., Kaufman, D.S., & Thomson, J.A., Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19 (3), 193-204 (2001).
- 23 Nardi, N. Beyer; da Silva Meirelles, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. In Wobus, Anna M.; Boheler, Kenneth. *Stem Cells. Handbook of experimental pharmacology*. 174. 249–82. (2006).
- 24 Salem H, Thiemermann C. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells*. 28:585-596 (2010)
- 25 Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*25 :977 –988, (2006)
- 26 Chen Y, Shao J, Xiang L, Dongb X, Zhang G. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell B*. 40: 815–820. (2008)
- 27 Osyczka, A.M., Noth, U., Danielson, K.G., & Tuan, R.S., Different osteochondral potential of clonal cell lines derived from adult human trabecular bone. *Ann N Y Acad Sci* 961, 73-77 (2002).
- 28 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 (2), 211-228 (2001).
- 29 Nakahara, H., Goldberg, V.M., & Caplan, A.I., Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 9 (4), 465-476 (1991).
- 30 De Bari, C., Dell'Accio, F., & Luyten, F.P., Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 44 (1), 85-95 (2001).
- 31 De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F.P., Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44 (8), 1928-1942 (2001).
- 32 Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD, Huard. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 18 (6), 933-944 (2000).
- 33 Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 264 (1), 51-62 (2001).
- 34 Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2 (6), 477-488 (2000).
- 35 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411), 143-147 (1999).
- 36 Caplan, A.I., Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9 (5), 641-650 (1991).

- 37 Caplan, A.I., Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213 (2), 341-347 (2007).
- 38 Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20 (5), 1060-1069 (2002)
- 39 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. Nov 30;131(5):861-72. (2007)
- 40 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20. Epub Nov 20. (2007)
- 41 da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*119:2204 –2213 (2006)
- 42 Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H. & Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301 (2006).
- 43 Katz, A.J., Tholpady, A., Tholpady, S.S., Shang, H. & Ogle, R.C. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23, 412-423 (2005).
- 44 Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 14, 311-324 (2004).
- 45 Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99, 1285-1297 (2006).
- 46 Vallée M, Côté F, Fradette J. Adipose-tissue engineering: Taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol.*:57:309–317 (2009)
- 47 Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. Nov;25(11):2739-49. Epub 2007 Jul 26 (2007).
- 48 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* .: 8(4):315-7 (2006)
- 49 Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Pürstner P, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion*. Aug;47(8):1426-35 (2007).
- 50 Lee SY, Lim J, Khang G, Son Y, Choung PH, Kang SS, Chun SY, Shin HI, Kim SY, Park EK. Enhanced ex vivo expansion of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells by fibroblast growth factor-2 and dexamethasone. *Tissue Eng Part A*. Sep;15(9):2491-9. (2009)
- 51 Baer PC, Griesche N, Luttmann W, Schubert R, Luttmann A, Geiger H. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. *Cytotherapy* .;12(1):96-106. (2010)
- 52 Farré J, Roura S, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Cairó JJ, Gòdia F, Bragós R, Cinca J, Bayes-Genis A. FGF-4 increases in vitro expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Growth Factors*. Apr;25(2):71-6. (2007)

- 53 Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G, Scarpa A, Dazzi F, Pizzolo G, Vinante F. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood*. Jul 1;106(1):59-66. Epub 2005 Mar 8. (2005)
- 54 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.,. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147. (1999)
- 55 Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev*. Oct;19(10):1449-70. (2010)
- 56 Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M.,. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49. (2002)
- 57 Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L., Chen, T.H.,. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103, 1669–1675 (2004)
- 58 Tomita, Y., Makino, S., Hakuno, D., Hattan, N., Kimura, K., Miyoshi, S., Murata, M., Ieda, M., Fukuda, K.,. Application of mesenchymal stem cell derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. *Med. Biol. Eng. Comput.* 45, 209–220. (2007)
- 59 Matsuda C, Takagi M, Hattori T, Wakitani S, Yoshida T. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocytes for construction of three-dimensional cartilage tissue. *Cytotechnology* 47:11–17. (2005)
- 60 Liu JW, Dunoyer-Geindre S, Serre-Beinier V, Mai G, Lambert JF, Fish RJ, Pernod G, Buehler L, Bounameaux H, Kruithof EK. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost* 5:826–834. (2007)
- 61 Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417–1426. (1995)
- 62 Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 10:3016–3020. (2004)
- 63 Gojo, S., Gojo, N., Takeda, Y., Mori, T., Abe, H., Kyo, S., Hata, J., Umezawa, A. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 288, 51–59. (2003)
- 64 Barbash, I.M., Chouraqui, P., Baron, J., Feinberg, M.S., Etzion, S., Tessone, A., Miller, J., Guetta, E., Zipori, D., Kedes, L.H., Kloner, R.A., Leor, J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108, 863–868. (2003)
- 65 Psaltis, P.J., Zannettino, A.C., Worthley, S.G., Gronthos, S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells* 26, 2201–2210. (2008)
- 66 Petrie Aronin, C.E., Tuan, R.S. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 90, 67–74. (2010)
- 67 Ankrum, J., Karp, J.M. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back. *Trends Mol. Med.* (2010)
- 68 Spring H, Schüler T, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102:18111–18116. (2005)

- 69 Husein K. Salem, Chris Tniemermann. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells, Translational and clinical research.* 2010;28:585–596 (2010)
- 70 Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*;106:1901–1910. (2005)
- 71 Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24:1030–1041 (2006)
- 72 Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, Sittiger M. Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 And CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem*;101:135–146. (2007)
- 73 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*;284:143–147.(1999)
- 74 Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*;181:67–73. (1999)
- 75 Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*;10:228–241. (2003)
- 76 Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*;104:2643–2645. (2004)
- 77 Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercuri A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*;106:419–427. (2005)
- 78 Li N, Lu X, Zhao X, Xiang FL, Xenocostas A, Karmazyn M, Feng Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha. *Stem Cells*; 27:961–970. (2009)
- 79 Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*;106:1331–1339. (2000)
- 80 Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*;180: 2581–2587. (2008)
- 81 Inokuma D, Abe R, Fujita Y, Sasaki M, Shibaki A, Nakamura H, McMillan JR, Shimizu T, Shimizu H. CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes. *Stem Cells*;24:2810–2816. (2006)
- 82 Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell*;18:2873–2882. (2007)
- 83 Giselle Chamberlain, James Fox, Brian Ashton, Jim Middleton. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stemcells*;25:2739–2749 (2007)

- 84 Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*;105:2214–2219. (2005)
- 85 Diefenderfer DL, Osyczka AM, Reilly GC, Leboy PS. BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res*; 44(suppl 1):305–311 (2003)
- 86 Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*;107:367–372. (2006)
- 87 Sensebé, L., Tarte, K., Galipeau, J., Krampera, M., Martin, I., Phinney, D.G., and Shi, Y. MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell* 10, 9–10, (2012).
- 88 Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, Roche E, Clemente EP, Enríquez JA, Bernad A, Samper E. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ* (2011)
- 89 Ben-David, U., Mayshar, Y., and Benvenisty, N. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell Stem Cell* 9, 97–102. (2011).
- 90 Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Splingard, M., Dulong J, Monnier D, Gourmelon P, Gorin NC, Sensebé L. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*;115, 1549–1553 (2010)
- 91 Takeuchi, M., Takeuchi, K., Ozawa, Y., Kohara, A., and Mizusawa, H.. Aneuploidy in immortalized human mesenchymal stem cells with non-random loss of chromosome 13 in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 45, 290–299 (2009)
- 92 Ben-David, U., Mayshar, Y., and Benvenisty, N.. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell Stem Cell* 9, 97–102 (2011)
- 93 Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R, Schichor C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 69, 5331–5339 (2009)
- 94 Torsvik A, Røslund GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E, Lønning PE, Primon M, Sobala E, Tonn JC, Goldbrunner R, Schichor C, Mysliwicz J, Lah TT, Motaln H, Knappskog S, Bjerkvig R. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res.* Aug 1;70(15):6393-6. Epub 2010 Jul 14. (2010)
- 95 de la Fuente R, Bernad A, Garcia-Castro J, Martin MC, Cigudosa JC. Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2010 Aug 15;70(16):6682.
- 96 Garcia, S., Bernad, A., Martín, M.C., Cigudosa, J.C., Garcia-Castro, J., and de la Fuente, R. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 316, 1648–1650 (2010).
- 97 L. Chen, E.E. Tredget, P.Y. Wu, Y. Wu, Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing, *PLoS ONE* 3 e1886. (2008)

- 98 E.Y. Lee, Y. Xia, W.S. Kim, M.H. Kim, T.H. Kim, K.J. Kim, B.S. Park, J.H. Sung, Hypoxia-enhanced wound healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF, *Wound Repair Regen.* 17:540–547 (2009)
- 99 Da Silva L, Fontes A, Tadeu D, Caplan A. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth F R.* 20:419–427 (2009)
- 100 Yi-Ling Si, Ya-Li Zhao, Hao-Jie Hao, Xiao-Bing Fu, Wei-Dong Han MSC: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns *Ageing Research Reviews* 10 93–103 (2011)
- 101 Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Stem Cells Dev. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Oct;19(10):1449-70.* (2010)
- 102 Mimeault M, Hauke R, Batra SK Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies.. *Clin Pharmacol Ther.* Sep;82(3):252-64. Epub 2007 Aug 1. (2007)
- 103 Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med.* May 10;9:52. (2011)
- 104 www.clinicaltrials.gov
- 105 Genentech The National Registry of Myocardial Infarction (NRFMI). (2005).
- 106 (AHA), A.H.A. Heart Disease and Stroke Statistics —Update. (2002)
- 107 Molkenkin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A. & Olson, E.N. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11, 1061-1072 (1997).
- 108 Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO, Smith SC Jr; ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America.. *Circulation* 104, 2996-3007 (2001).
- 109 Stewart, S., MacIntyre, K., Hole, D.J., Capewell, S. & McMurray, J.J. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 3, 315- 322 (2001).
- 110 Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344, 1750-1757 (2001).
- 111 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10344-10349 (2001).
- 112 Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8801-8805 (1998).
- 113 Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 114(6),763-776 (2003).
- 114 Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult

- myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(21),12313-12318 (2003).
- 115 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 938,221-229 (2001).
- 116 Chachques JC. Cardiomyoplasty: is it still a viable option in patients with end-stage heart failure? *Eur J Cardiothorac Surg*. Feb;35(2):201-3. (2009)
- 117 Bayes-Genis A, Soler-Botija C, Farré J, Sepúlveda P, Raya A, Roura S, Prat-Vidal C, Gálvez-Montón C, Montero JA, Büscher D, Izpisua Belmonte JC. Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. *J Mol Cell Cardiol*. Nov;49(5):771-80 (2010)
- 118 Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, Martens TP, Radisic M. *Tissue Eng Part B Rev*. Apr;16(2):169-87. Challenges in cardiac tissue engineering. (2010)
- 119 Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 75(3),775-779 (2003)
- 120 Behfar A, et al. Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 56,721-34 (2010).
- 121 Roura S, et al. Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Basic Res Cardiol*. 105,419-30 (2010)
- 122 Koh, G.Y., Klug, M.G., Soonpaa, M.H. & Field, L.J. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest* 92, 1548-1554 (1993).
- 123 Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 4, 929-933 (1998).
- 124 Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357, 279-280 (2001).
- 125 Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41, 1078-1083 (2003).
- 126 Rubart, M., Soonpaa, M.H., Nakajima, H. & Field, L.J. Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest* 114, 775-783 (2004).
- 127 Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7808-7811 (2003).
- 128 Menasche, P. Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2, 21-28 (2004).
- 129 Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT, Pouzet B, Schwartz K, Menasché P, Hagege AA. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 106, 1131-136 (2002).
- 130 Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alhéritière A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasché P. Skeletal Myoblast Transplantation in Ischemic Heart Failure: Long-Term Follow-Up of the First Phase I Cohort of Patients. *Circulation* 114, 1-108-113 (2006).

- 131 Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 107, 461-468 (2003).
- 132 Isner, J.M., Kalka, C., Kawamoto, A. & Asahara, T. Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann N Y Acad Sci* 953, 75-84 (2001).
- 133 Li ZQ, Zhang M, Jing YZ, Zhang WW, Liu Y, Cui LJ, Yuan L, Liu XZ, Yu X, Hu TS. The clinical study of autologous peripheral blood stem cell transplantation by intracoronary infusion in patients with acute myocardial infarction (AMI). *Int J Cardiol* 115, 52- 56 (2007).
- 134 Tatsumi T, Ashihara E, Yasui T, Matsunaga S, Kido A, Sasada Y, Nishikawa S, Hadase M, Koide M, Nakamura R, Irie H, Ito K, Matsui A, Matsui H, Katamura M, Kusuoka S, Matoba S, Okayama S, Horii M, Uemura S, Shimazaki C, Tsuji H, Saito Y, Matsubara H. Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 71, 1199-1207 (2007).
- 135 Kang HJ, Lee HY, Na SH, Chang SA, Park KW, Kim HK, Kim SY, Chang HJ, Lee W, Kang WJ, Koo BK, Kim YJ, Lee DS, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Park YB, Kim HS. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3- DES randomized, controlled trial. *Circulation* 114, 1145-1151 (2006).
- 136 Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 44, 1690-1699 (2004).
- 137 Dimmeler, S., Koyanagi, M., Urbich, C. & Zeiher, A.M. in *Cardiovascular Regeneration and Stem Cell Therapy*, Edn. 1st. (eds. A. Leri, P. Anversa & W.H. Frisman) Blackwell Futura, Massachusetts; (2007).
- 138 Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91, 189-201 (2002).
- 139 Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 58, 278-291 (2003).
- 140 He, J.Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J.A. & Kamp, T.J. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93, 32-39 (2003).
- 141 Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 1282-1289 (2004).
- 142 Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marbán E, Tomaselli GF, Li RA. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 111, 11-20 (2005).
- 143 Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, Morgan JP, Xiao YF. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125, 361-369 (2003)
- 144 Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, Lebl DR, Caffarelli AD, de Bruin JL, Fedoseyeva EV, Robbins RC. Embryonic stem cell immunogenicity

- increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 112, 1166-172 (2005).
- 145 Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 113, 1005-1014 (2006).
- 146 Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 111, 150-156 (2005).
- 147 Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, Zhang JJ, Lin S, Liao LM, Zhao RC.. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 117, 1443-1448 (2004).
- 148 Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, Zhu Z, Lin S, Kwan TW. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* 18, 552-556 (2006).
- 149 Katz AJ, Yang Z, Shang H, Chamberlain AT, Berr SS, Roy RJ, Khurgel M, Epstein FH, French BA. Serial MRI assessment of human adiposederived stem cells (HASCs) in a murine model of reperfused myocardial infarction. *Adipocytes* (2006).
- 150 Mazo M, Planat-Bénard V, Abizanda G, Pelacho B, Léobon B, Gavira JJ, Peñuelas I, Cemborain A, Pénicaud L, Laharrague P, Joffre C, Boisson M, Ecay M, Collantes M, Barba J, Casteilla L, Prósper F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *European Journal of Heart Failure* 10, 454-462 (2008).
- 151 Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 12, 459-465 (2006).
- 152 Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1222, (2006)
- 153 Povsic TJ, O'Connor CM, Henry T, Taussig A, Kereiakes DJ, Fortuin FD, Niederman A, Schatz R, Spencer R 4th, Owens D, Banks M, Joseph D, Roberts R, Alexander JH, Sherman W. A double-blind, randomized, controlled, multicenter study to assess the safety and cardiovascular effects of skeletal myoblast implantation by catheter delivery in patients with chronic heart failure after myocardial infarction. *Am Heart J.* Oct;162(4): 654-662.e1. (2011)
- 154 Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 11474,(2005).
- 155 Masuda S, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for heart tissue repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Jan 14;60(2):277-85. Epub Oct 9. (2007)
- 156 Christman KL, Fok HH, Sievers RE, Fang Q, Lee RJ. Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Eng.* Mar-Apr;10(3-4):403-9. (2004)

- 157 Tokunaga M, Liu ML, Nagai T, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, Kanda M, Kondo N, Wang P, Naito AT, Komuro I. Implantation of cardiac progenitor cells using self-assembling peptide improves cardiac function after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Dec;49(6):972-83. Epub Sep 24. (2010)
- 158 Leor J, Aboulaflia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation.*;102:III56–61. (2000)
- 159 Vizzardì E, Lorusso R, De Cicco G, Zanini G, D'aloia A, Dei Cas L. Stem cells and repair of the heart: cell-releasing epicardial scaffolds. *J Cardiovasc Surg (Torino).* Jan 17. (2012)
- 160 Cortes-Morichetti M, Frati G, Schussler O, Duong Van Huyen JP, Lauret E, Genovese JA, Carpentier AF, Chachques JC. Association between a cell-seeded collagen matrix and cellular cardiomyoplasty for myocardial support and regeneration. *Tissue Eng. Nov;*13(11):2681-7. (2007)
- 161 Chachques JC, Duarte F, Cattadori B, Shafy A, Lila N, Chatellier G, Fabiani JN, Carpentier AF. Angiogenic growth factors and/or cellular therapy for myocardial regeneration: a comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Aug;128(2):245-53, (2004)
- 162 Ferreira, L.S., Gerecht, S., Fuller, J., Shieh, H.F., Vunjak-Novakovic, G., and Langer, R. Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 28, 2706, (2007)
- 163 Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 113 (7), 1005-1014 (2006).
- 164 Danino, T., Volfson, D., Bhatia, S.N., Tsimring, L., & Hasty, J., In-silico patterning of vascular mesenchymal cells in three dimensions. *PLoS One* 6 (5), e20182. (2011)
- 165 Wu, J.C., Sundaresan, G., Iyer, M., & Gambhir, S.S., Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* 4 (4), 297-306 (2001).
- 166 Bhaumik, S. & Gambhir, S.S., Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (1), 377-382 (2002).
- 167 Wu, J.C., Sundaresan, G., Iyer, M., & Gambhir, S.S., Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* 4 (4), 297-306 (2001).
- 168 Rome, C., Couillaud, F., & Moonen, C.T., Gene expression and gene therapy imaging. *Eur Radiol* 17 (2), 305-319 (2007).
- 169 Vilalta M, Jorgensen C, Dégano IR, Chernajovsky Y, Gould D, Noël D, Andrades JA, Becerra J, Rubio N, Blanco J. Dual luciferase labelling for non-invasive bioluminescence imaging of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in demineralized bone matrix scaffolds. *Biomaterials* 30 (28), 4986-4995 (2009).
- 170 Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, Salas C, Serrano A, Vicario JL, Cuesta AM, Compte M, Sánchez-Martín D, Alvarez-Vallina L.. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvascular research* 75, 308-314 (2008).
- 171 Ray, P., De, A., Min, J. J., Tsien, R. Y. & Gambhir, S. S. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer research* 64, 1323-1330 (2004)
- 172 Rigola MA, Fuster C, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Gelabert A, Egozcue J, Miro R. Comparative genomic hybridization analysis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 127: 59-63 (2001)

- 173 Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* Feb 15;31(4):e15 (2003).
- 174 Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4), 402-408 (2001).
- 175 Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44 (4), 503-512 (1979)
- 176 Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 269 (6 Pt 2), H2147-2154 (1995)
- 177 Fishbein, M.C., Maclean, D., & Maroko, P.R., Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 90 (1), 57-70 (1978),
- 178 Fishbein, M.C., Maclean, D., & Maroko, P.R., The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 73 (6), 843-849 (1978).
- 179 Litwin, S.E., Katz, S.E., Morgan, J.P., & Douglas, P.S., Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 89 (1), 345-354 (1994).
- 180 Augustin-Voss, H.G., Smith, C.A., & Lewis, R.M., Phenotypic characterization of normal and neoplastic canine endothelial cells by lectin histochemistry. *Vet Pathol* 27 (2), 103-109 (1990),
- 181 Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 91 (11), 2793-2801 (1995).
- 182 Mesnil, M., Piccoli, C., Tiraby, G., Willecke, K., & Yamasaki, H., Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (5), 1831-1835 (1996)
- 183 Matuskova M, Hlubinova K, Pastorakova A, Hunakova L, Altanerova V, Altaner C, Kucerova L., HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett* 290 (1), 58-67 (2010).
- 184 Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, Inoue K, Kato H, Aoi N, Murase S, Sato K, Gonda K, Koshima I, Yoshimura K. Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cytotherapy*.;9(8):738-45. (2007)
- 185 König J, Huppertz B, Desoye G, Parolini O, Fröhlich JD, Weiss G, Dohr G, Sedlmayr P, Lang I Amnion-Derived Mesenchymal Stromal Cells Show Angiogenic Properties but Resist Differentiation into Mature Endothelial Cells. *Stem Cells Dev.* Sep 6 (2011)
- 186 Yu J, Huang NF, Wilson KD, Velotta JB, Huang M, Li Z, Lee A, Robbins RC, Cooke JP, Wu JC nAChRs mediate human embryonic stem cell-derived endothelial cells: proliferation, apoptosis, and angiogenesis *PLoS One.* Sep 15;4(9):e7040.(2009)
- 187 Sprague L, Muccioli M, Pate M, Meles E, McGinty J, Nandigam H, Venkatesh AK, Gu MY, Mansfield K, Rutowski A, Omosebi O, Courreges MC, Benencia F. The interplay between surfaces and soluble factors define the immunologic and angiogenic properties of myeloid dendritic cells. *BMC Immunol.* Jun 6;12:35. (2011)
- 188 Xie SZ, Fang NT, Liu S, Zhou P, Zhang Y, Wang SM, Gao HY, Pan LF. Differentiation of smooth muscle progenitor cells in peripheral blood and its application in tissue engineered blood vessels. *J Zhejiang Univ Sci B.* Dec;9(12):923-30. (2008)

- 189 Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*. Sep 3;106(10):1199-204. (2002)
- 190 Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*;81:1390-7. (2006)
- 191 Studeny M, Marini FC, Champlin RE, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*;62:3603-8 (2002)
- 192 Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*; 11:389-98. (2005)
- 193 Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*. Jun;28(6):707-15. (2000)
- 194 Imhof, B.A. & Dunon, D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* 58, 345-416 (1995).
- 195 Watt, S.M., Gschmeissner, S.E. & Bates, P.A. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* 17, 229-244 (1995).
- 196 Patey, N. et al. Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells. Expression in tumors but not in inflammatory responses. *Am J Pathol* 148, 465-472 (1996).
- 197 Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*.;4:2868-2880 (1990)
- 198 Dittel BN, McCarthy JB, Wayner EA, LeBien TW. Regulation of human B-cell precursor adhesion to bone marrow stromal cells by cytokines that exert opposing effects on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Blood*.;81(9):2272-2282 (1993).
- 199 Elices MJ, Osborn L, Takada Y, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cel*.;60:577-584, (1990).
- 200 Corbeil, D. et al. The Human AC133 Hematopoietic Stem Cell Antigen Is also Expressed in Epithelial Cells and Targeted to Plasma Membrane Protrusions. *J. Biol. Chem.* 275, 5512-5520 (2000).
- 201 Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D. & Rafii, S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 715-719 (2005).
- 202 Ohtani N, Mann DJ, Hara E. Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci*.;100(5):792-797. (2009)
- 203 Rubio D, Garcia S, De la Cueva T, Paz MF, Lloyd AC, Bernad A, Garcia-Castro J. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. *Exp Cell Res*. Feb 15;314(4):691-8.(2008)
- 204 Nakanishi C, Nagaya N, Ohnishi S, Yamahara K, Takabatake S, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Tsubokawa T, Yamagishi M. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circ J*.;75(9):2260-8 (2011)
- 205 Hall B, Andreeff M, Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol*.;(180):263-83. Review. (2007)
- 206 Vilalta M, Dégano IR, Bagó J, Aguilar E, Gambhir SS, Rubio N, Blanco J. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as vehicles for tumor bystander effect: a model based on bioluminescence imaging. *Gene Ther*. Apr;16(4):547-57(2009)

- 207 Alieva M, R. Bagó J, Aguilar E, Soler-Botija C, Fernandez O, Mollet J, S Gambhir S, Rubio N, Blanco J. Glioblastoma Therapy with Cytotoxic Mesenchymal Stromal Cells Optimized by Bioluminescence Imaging of Tumor and Therapeutic Cell Response. Aceptado para publicación en PLoS One 2012.
- 208 Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, Seidensticker M, Ricke J, Altman AM, Devarajan E, Liu W, Arlinghaus RB, Alt EU. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis*. Apr;30(4):589-97. Epub 2009 Jan 30. (2009)
- 209 Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer*. Nov 15;127(10):2323-33. (2010)
- 210 Dwyer RM, Khan S, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res Ther*. Aug 9;1(3):25. (2010)
- 211 Iyengar P, Combs TP, Shah SJ, Gouon-Evans V, Pollard JW, Albanese C, Flanagan L, Tenniswood MP, Guha C, Lisanti MP, Pestell RG, Scherer PE. Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*. Sep 25;22(41):6408-23. (2003)
- 212 Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*;21:304–10. (2007)
- 213 Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*.;109:1292–1298. (2004)
- 214 Planat-Benard V, Silvestre JS, 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. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*.;109:656 – 663. (2004)
- 215 Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T, Nagai R. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sciences*. (2006).
- 216 Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS, March KL. IFATS Series: human adipose tissue– derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. (2008).
- 217 Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, Pelacho B, Leobon B, Gavira JJ, Penuelas I, Cemborain A, Penicaud L, Laharrague P, Joffre C, Boisson M, Ecay M, Collantes M, Barba J, Casteilla L, Prosper F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*.;10:454–462. (2008)
- 218 Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*.;12:459–465. (2006)
- 219 Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*.;109:1292–1298. (2004)

-
- 220 Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, Nishimura S, Manabe I, Gonda K, Yoshimura K. IFATS Series: FGF-2-induced HGF secretion by adipose-derived stromal cells inhibits post-injury fibrogenesis through a JNK-dependent mechanism. *Stem Cells*;27:238–249. (2009)
- 221 Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT: Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell*, 8(4):389-398. (2011)
- 222 Guo, J., Lin, G.S., Bao, C.Y., Hu, Z.M., Hu, M.Y.,. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation* 30, 97–104. (2007)
- 223 Du, Y.Y., Zhou, S.H., Zhou, T., Su, H., Pan, H.W., Du, W.H., Liu, B., Liu, Q.M.,. Immunoinflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction. *Cytotherapy* 10, 469–478. (2008)
- 224 Paul, D., Samuel, S.M., Maulik, N.,. Mesenchymal stem cell: present challenges and prospective cellular cardiomyoplasty approaches for myocardial regeneration. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1841–1855. (2009)
- 225 Nakanishi, C., Yamagishi, M., Yamahara, K., Hagino, I., Mori, H., Sawa, Y., Yagihara, T., Kitamura, S., Nagaya, N.,. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 11–16. (2008)
- 226 Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest.* Dec;57(6):673-86 (1987)
- 227 Thompson WD, Smith EB, Stirk CM, Marshall FI, Stout AJ, Kocchar A. Angiogenic activity of fibrin degradation products is located in fibrin fragment E. *JPathol. Sep*;168(1):47-53 (1992).
- 228 Sahni, A., Odrjlin, T., & Francis, C.W., Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 273 (13), 7554-7559 (1998).
- 229 Harrison, P. & Cramer, E.M., Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 7 (1), 52-62 (1993).

REFERENCIAS DEL APENDICE:

- 230 Takeshita, S. et al. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol* 147, 1649-1660 (1995).
- 231 Michael, L.H. et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 269, H2147-2154 (1995).
- 232 Mestas, J. & Hughes, C.C.W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol* 172, 2731-2738 (2004).
- 233 Masson, N.M. et al. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G45-54 (2006).
- 234 Nakamura, Y. et al. Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *British Journal of Dermatology* 154, 1062-1070 (2006).
- 235 Abeysinghe, H.R. et al. THY1 expression is associated with tumor suppression of human ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 143, 125-132 (2003).
- 236 Barry FP et al The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochemical Biophysical Research Communications* 289(2): 519-524 (2001)
- 237 Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. & May, W.S. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13 (1996).
- 238 Healy, L. et al. The Stem Cell Antigen CD34 Functions as a Regulator of Hemopoietic Cell Adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 12240-12244 (1995).
- 239 Neil A. Barclay, S.K.A.L., Andrew J. McKnight The Leucocyte Antigen Factsbook, Edn. 1st. (1993).
- 240 Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B. & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313 (1990).
- 241 Lesley, J. & Hyman, R. CD44 structure and function. *Front Biosci* 3, d616-630 (1998).
- 242 Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*;4:2868-2880 (1990)
- 243 Dittel BN, McCarthy JB, Wayner EA, LeBien TW. Regulation of human B-cell precursor adhesion to bone marrow stromal cells by cytokines that exert opposing effects on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Blood.*;81(9):2272-2282 (1993).
- 244 Elices MJ, Osborn L, Takada Y, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cel.*;60:577-584, (1990).
- 245 Brummendorf, T. & Rathjen, F.G. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 2, 963-1108 (1995).
- 246 Imhof, B.A. & Dunon, D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* 58, 345-416 (1995).
- 247 Iiyama, K. et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 85, 199-207 (1999).
- 248 Mueller, J.P. et al. Porcine vascular cell adhesion molecule (VCAM) mediates endothelial cell adhesion to human T cells. Development of blocking antibodies specific for porcine VCAM. *Transplantation* 60, 1299-1306 (1995).

-
- 249 Chin, J.E. et al. Airway recruitment of leukocytes in mice is dependent on alpha4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. *Am J Physiol* 272, L219-229 (1997).
- 250 Imhof, B.A. & Dunon, D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* 58, 345-416 (1995).
- 251 Watt, S.M., Gschmeissner, S.E. & Bates, P.A. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* 17, 229-244 (1995).
- 252 Patey, N. et al. Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells. Expression in tumors but not in inflammatory responses. *Am J Pathol* 148, 465-472 (1996).
- 253 Corbeil, D. et al. The Human AC133 Hematopoietic Stem Cell Antigen Is also Expressed in Epithelial Cells and Targeted to Plasma Membrane Protrusions. *J. Biol. Chem.* 275, 5512-5520 (2000).
- 254 Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D. & Rafii, S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 715-719 (2005).
- 255 DeLisser, H.M., Newman, P.J. & Albelda, S.M. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 15, 490-495 (1994).
- 256 DeLisser, H.M. et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 151, 671-677 (1997).
- 257 Lampugnani, M.G. et al. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* 118, 1511-1522 (1992).
- 258 Gotsch, U. et al. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 110, 583-588 (1997).
- 259 Vestweber, D. VE-Cadherin: The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 223-232 (2008).
- 260 Ashman, L.K., Cambareri, A.C., To, L.B., Levinsky, R.J. & Juttner, C.A. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 78, 30-37 (1991).
- 261 Lerner, N.B. et al. Monoclonal antibody YB5.B8 identifies the human c-kit protein product. *Blood* 77, 1876-1883 (1991).
- 262 Mayrhofer, G., Gadd, S.J., Spargo, L.D. & Ashman, L.K. Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast cells in human mucosal and connective tissues. *Immunol Cell Biol* 65 (Pt 3), 241-250 (1987).
- 263 Galli, S.J., Zsebo, K.M. & Geissler, E.N. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 55, 1-96 (1994).