



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPTO. DE BIOLOGIA CELULAR, HISTOLOGIA Y FARMACOLOGIA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEON (INCYL)

ESTUDIO CUANTITATIVO DEL CRECIMIENTO DE CULTIVO DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

Carolina Magdalena Atea

Valladolid - 2012

Tutor: Dr. Manuel Garrosa

Trabajo fin de Master en Investigación de Ciencias de la Salud en Neurobiología.

INDICE	Pág.
I INTRODUCCION	3
I.1. CELULAS MADRE	3
I.1.1. Características generales	3
I.1.2. Recuerdo histórico	3
I.1.3. Clasificación	5
I.1.3.1. Plasticidad de las células madre adultas	7
I.2. CELULAS MADRE MESENQUIMALES	8
I.2.1. Recuerdo histórico	8
I.2.2. Características generales	9
I.2.3. Definición	9
I.2.4. Origen	10
I.2.5. Características fenotípicas	10
I.2.6. Aplicación en la investigación clínica	11
I.3. CELULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO	12
I.3.1. Características generales	12
I.3.2. Características fenotípicas	13
I.3.3. Proceso de diferenciación	13
I.3.4. Implicaciones clínicas	14
II OBJETIVOS	17
III MATERIAL Y METODOS	18
IV RESULTADOS	23
V DISCUSION	31
VI CONCLUSIONES	33
VII BIBLIOGRAFIA	34

I. INTRODUCCION

I.1. CELULAS MADRE

I.1.1. Características generales

Las células madre (SC- Stem Cells) son un tipo especial de células indiferenciadas, con la especial capacidad de dividirse indefinidamente y diferenciarse a su vez, en distintos tipos de células especializadas, tanto desde el punto de vista morfológico como funcional. Tienen el potencial para convertirse en distintos tipos celulares en el organismo. Por una parte, permiten el desarrollo de un individuo a partir de un ovulo fecundado durante el periodo embrionario y, por otra, durante la adultez, su principal función es sustituir las células que requieren ser renovadas y reparar tejidos lesionados. Cuando una SC se divide, cada nueva célula tiene la capacidad de dar lugar a otra célula madre o diferenciarse hasta convertirse en otro tipo celular con una función especializada. Su investigación ha proporcionado un conocimiento avanzado sobre el desarrollo de un organismo partiendo desde una única célula. Otro de los conocimientos que ha aportado ha sido la posibilidad de reemplazar células saludables por otras dañadas en el organismo de individuos adultos (Weissman 2000).

Debido a estas características su estudio ocupa un campo muy importante dentro de la investigación. La posible aplicación clínica en la restitución de tejidos, el remplazo de células y en definitiva, el tratamiento y posible curación de enfermedades; es el objetivo principal y un estímulo importante para continuar con los mismos.

I.1.2. Recuerdo histórico

Aunque el concepto de células madre fue introducido hace más de un siglo por Alejandro Maximow (1909), las investigaciones modernas sobre células madre tienen su comienzo en 1963, cuando James Hill, Ernest McCullough y Lou Siminovitch

establecieron ensayos para descubrir las células madre hematopoyéticas (HSCs). El grupo las encontró en la médula ósea de ratones. Sus experimentos demostraron que las células de la médula ósea podrían reconstituir hematopoyesis y por lo tanto sanar animales letalmente irradiados. Usando una serie de trasplantes, establecieron la habilidad de autorregeneración de las células originales de la médula ósea. Cuando células de colonias esplénicas de médula ósea fueron trasplantadas en otros animales que habían recibido una dosis letal de radiación, se observó el desarrollo de colonias de glóbulos blancos y rojos.

En las bases de estos experimentos, el grupo definió las HSCs como células que tenían “habilidades de libre regeneración así como diferenciación multilineal”. Este descubrimiento marcó el principio de la investigación sobre células madre de la actualidad (Siminovitch 1963).

También en esta década destacaron los trabajos de Joseph Altman y Gopal Das, los cuales presentaron evidencias de neurogénesis en adultos, demostrando así la actividad de células madre en el cerebro (y refutando la teoría sobre la no regeneración neuronal) (Altman 1965-1966).

En 1981, Evans y Kaufman diferenciaron células madre embrionarias de ratón a partir de la masa celular interna de blastocistos. Establecieron, a su vez, las condiciones de cultivo para el crecimiento pluripotente de células madre embrionarias de ratón ‘in vitro’.

Las líneas celulares derivadas de células madre embrionarias que presentaron cariotipo diploide y normal, generaron derivados de todas y cada una de las tres primeras capas germinales como células germinales primordiales (Evans 1981). Entre 1984 y 1988, Andrews desarrolló células pluripotentes, idénticas genéticamente (clones), llamadas ‘células de carcinoma embrionario’, a partir de Tera-2, una línea celular de teratocarcinoma humano testicular.

Las células clonadas a partir de teratoma humano exponían una diferencia en cuanto a ácido retinoico en células ‘tipo neuronas’ y otros tipos celulares (Andrews et al 1984-1988). En 1992, las primeras células madre neurales fueron cultivadas “in vitro”. Entre los años 95 y 96, células madre embrionarias (CME) de primates no humanos se diferenciaron y mantuvieron “in vitro”, primero a partir de la masa celular interna de mono Rhesus y después a partir de marmotas. Las CME de primates eran diploides y tenían cariotipos normales. Eran pluripotentes y se diferenciaban en tipos celulares derivados de las tres primeras capas germinales.

Las CME de primates se asemejaban a las CME de humanos lo que indicaba que podría ser posible el mantenimiento de CME humanas “in vitro”.

En 1998, Thompson expandió CME humanas a partir de la masa celular interna de blastocistos humanos normales donados por una pareja bajo tratamiento de fertilidad (Thompson et al. 1998).

A partir de ese momento, grupos de investigación de todo el mundo han estudiado las características moleculares de estas células y han desarrollado sistemas más eficaces para cultivarlas “in vitro”. Además, se han hecho avances muy importantes a la hora de dirigir estas células hacia un tipo celular concreto. Esto ha originado también, que las células madre hayan adquirido un gran potencial terapéutico por sus aplicaciones en la regeneración de tejidos dañados.

I.1.3. Clasificación

Las SC pueden clasificarse según su potencial de diferenciación en:

Totipotenciales: son aquellas células capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario. Tienen el potencial necesario para convertirse en cualquier célula humana de manera indefinida. Por lo que poseen la capacidad de dar origen a todo un individuo. Pueden generar dos tipos de células: células hijas capaces de diferenciarse en una línea particular (células pluripotenciales) y nuevas células con pleno potencial de diferenciación (nuevas células totipotenciales). A esta última y muy importante característica se denomina capacidad de autorrenovarse. Se trata de una división asimétrica, por una parte se genera una célula distinta con capacidad para diferenciarse en una línea determinada y, al mismo tiempo, se generan células con capacidad para seguir siendo madres. Su ADN no contiene plegamientos por lo que es perfectamente legible, es decir se pueden leer todos los genes.

Pluripotenciales: son células con habilidad para diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias. A medida que el embrión sigue su desarrollo y se van produciendo más divisiones celulares, las células embrionarias se van diferenciando hacia funciones y estirpes celulares determinados. Esta diferenciación se consigue a través de plegamientos del ADN celular que dejan, de esa forma, ilegibles los genes que no va a expresar esa célula. Por lo tanto son incapaces de desarrollar un embrión completo.

Las células pluripotenciales en su desarrollo poseen dos cualidades básicas: la pluripotencialidad y la diferenciación, que se contraponen: cuanto más pluripotencialidad posee una célula, menos grado de diferenciación tiene, y a la inversa. La pluripotencialidad, propia de la célula inmadura o indiferenciada, es la capacidad de una célula para convertirse en todas las posibles estirpes celulares. La diferenciación sin embargo es la cualidad por la cual la célula adquiere ya una especialización dentro de un tipo celular concreto que le hace no poder convertirse en otro tipo celular distinto.

Multipotenciales: son células con la capacidad de diferenciarse en distintos tejidos de la misma capa embrionaria (endodermo, mesodermo, ectodermo).

Unipotenciales: solo dan lugar a una línea celular.

Según su origen las SC se pueden clasificar en:

a) Células madre embrionarias: incluyen las células totipotenciales y pluripotenciales.

El cigoto formado tras la fecundación de un óvulo por un espermatozoide es una célula capaz de generar un nuevo individuo completo. Se trata, pues, de una célula totipotencial. Entre los días primero al cuarto del desarrollo embrionario, la célula original va dividiéndose en varias células más.

A partir del cuarto día del desarrollo embrionario humano se forma el blastocisto. El blastocisto está formado por dos tipos de células y una gran cavidad interior:

Capa externa: forma la placenta y las envolturas embrionarias. Es el trofoblasto.

Masa celular interna: formará todos los tejidos del cuerpo humano. Se denomina embrioblasto. Las células de un blastocisto tienen capacidad de originar cualquier tipo de tejido pero no son capaces de generar un individuo completo, es decir, ya no son totipotenciales sino pluripotenciales.

b) Células madre germinales: tienen capacidades parecidas a las embrionales y pueden encontrarse en la llamada cresta gonadal de los fetos humanos de 5 a 10 semanas. De ellas se derivarán las células gaméticas durante la vida fértil del individuo.

c) Células madre adultas: abarcan las multipotenciales y unipotenciales. Se originan por la división de las células madre embrionarias. Se encuentran repartidas por gran cantidad de tejidos del organismo como cerebro, médula ósea, músculo, piel, intestino, hígado, páncreas, tejido adiposo, retina, etc. Su principal función es la de sustituir a células en continuo recambio como ocurre con las células de la piel, tracto gastro-intestinal o la sangre. También actúan cuando hay tejidos dañados, aun migrando a sitios lejanos desde su origen (Weissman et al. 2001).

Se han descrito diferentes tipos de células madre adultas: hematopoyéticas (HSC), mesenquimáticas (MSC), las llamadas *side population cells* (SP), las células progenitoras adultas multipotenciales o MAPC y las célula madre inducidas (IPS- Induced pluripotent stem).

Las HSC se han identificado tanto in vitro como in vivo y se utilizan clínicamente desde hace años.

Las SP se han aislado tanto de la médula ósea como del músculo. Han sido estudiadas recientemente en el daño miocárdico (Asukura et al. 2002).

Las MAPC se han obtenido de la médula ósea humana y de ratón y poseen capacidad pluripotencial (Jiang et al. 2002).

Las IPS son células diferenciadas que pueden ser reprogramadas a un estado embrionario por transferencia de contenidos nucleares o por fusión con células madre embrionarias. Una vez terminado el proceso presentan la morfología, las propiedades de crecimiento y los marcadores típicos de una célula madre embrionaria multipotente. En 2006 Takahashi obtuvo desde fibroblastos células madre multipotentes (Takahashi et al. 2006).

I.1.3.1 Plasticidad de las células madre adulta.

El término plasticidad hace referencia a la capacidad de algunas células adultas para generar progenitores apropiados cuando se las coloca en un nuevo tejido. Es decir, la célula madre adulta puede transdiferenciarse, cambiar su destino, alojarse por vía

sanguínea en tejidos lejanos al que reside habitualmente y ser capaz de regenerar esos tejidos. El microambiente, la matriz extracelular, los factores de crecimiento y la diferenciación desempeñan un papel clave en la función de la célula madre. Se ha demostrado que el nicho o microambiente controla muchas facetas de estas células, como su división, orientación y el tipo de división (simétrica o asimétrica).

Los criterios para establecer la plasticidad de una célula serían:

1. Demostrar que un gen, previamente silente y específico del nuevo tipo celular, se expresa en la célula de interés.
2. Demostrar que la célula está bien integrada en la estructura del nuevo tejido y es morfológicamente indistinguible de las células vecinas derivadas del huésped.
3. Realizar un ensayo funcional; es decir, demostrar la producción de una enzima deficiente u otra molécula específica de un órgano, en un animal genéticamente deficiente (Garrido 2003).

Se han descrito varios ejemplos de plasticidad en la literatura médica. Uno de los trabajos más importantes fue realizado por Clarke et al, quienes demostraron que una célula adulta implantada en la cavidad amniótica de un embrión puede diferenciarse hacia las tres capas germinales (Clarke et al. 2000).

I.2. CELULAS MADRE MESENQUIMALES

I.2.1. Recuerdo histórico

La presencia de células madre no hematopoyéticas en la médula ósea fue descubierta por primera vez por el patólogo alemán (Cohnheim 1867). Años más tarde Friedenstein puso en evidencia que otras células mesenquimales, como los fibroblastos, podían ser encontrados en la médula ósea. Las describía como células adherentes homogéneas con forma de huso que, posterior a estar inactivas durante dos a cuatro días, comenzaban a multiplicarse rápidamente. Dichas células podían, a su vez, diferenciarse en colonias que aparentaban depósitos de hueso y cartílago (Friedenstein 1976). Grupos de investigadores posteriores de los años 80 utilizaron

el mismo método de Friedenstein y lograron obtener colonias de osteoblastos, condrocitos, adipocitos y mioblastos (Ashton et al. 1980, Castro-Malaspina et al. 1980, Bab et al. 1986).

I.2.2 Características generales

Las células madre mesenquimales (MSC-mesenchymal stem cells) son aquellas células que originalmente se consideraba que poseían la habilidad de diferenciarse en tejidos derivados del mesoderma: músculo esquelético, hueso, tendones, cartílago y tejido adiposo. Pero se ha comprobado que este potencial no es exclusivo, ya que, estudios recientes han demostrado también la capacidad de diferenciación a células o tejidos no mesodérmicos; como por ejemplo: neuronas, microglía, oligodendroglia, astroglia, células endocrinas pancreáticas, hepatocitos, células endoteliales y cardiomiocitos. A esta asombrosa capacidad se ha denominado transdiferenciación (cross-differentiation o cross-germ plasticity) y podría deberse a un fenómeno de fusión celular, por el cual el contacto célula- célula, determinaría la adquisición de un nuevo fenotipo celular (Pittenger et al. 1999, Woodbury et al. 2000).

Se ha hipotetizado, a su vez, que este hecho pueda ser explicado por la migración, durante el desarrollo embrionario, de células desde el ectoderma (Tholpady et al. 2003).

I.2.3. Definición

La sociedad internacional de terapia celular a través de su comité de células madre mesenquimales han propuesto los siguientes criterios para definir MSC humana:

- 1.- La MSC debe mantenerse adherida al plástico bajo condiciones de cultivo estándar.
- 2.- La MSC tiene que tener la habilidad de diferenciación en osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis.
- 3.- La MSC tiene que expresar CD73, CD90 y CD105.
- 4.- La MSC no debe expresar CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79a ni HLA-DR (Dominici et al. 2006).

I.2.4. Origen

Las MSC humanas pueden ser obtenidas de diferentes tejidos: médula ósea, tejido adiposo, periostio, líquido amniótico y tejidos fetales (sobre todo durante el primer y segundo trimestre de embarazo en sangre, hígado, bazo y médula ósea) (Nakahara et al. 1991, Campagnoli et al. 2001, In't Anker et al. 2003). Aunque también ha sido sugerido que pueden encontrarse virtualmente en todos los órganos y tejidos postnatales.

Estas células también pueden obtenerse de diferentes especies como el ratón, la rata, el gato, el perro, el conejo, cerdos y babuinos.

En un reciente trabajo realizado en ratas macho Sprague-Dawley de 12 semanas de edad, se analizaron las MSC provenientes de tejido sinovial, periostio, médula ósea, músculo esquelético y tejido adiposo; encontrando mayor número de células, mayor multiplicación y capacidad de diferenciación en las MSC provenientes de tejido sinovial (Yoshimura et al. 2007).

I.2.5. Características fenotípicas

Fenotípicamente las MSC en humanos expresan un número de marcadores que, mediante citometría de flujo, permiten la posibilidad de poder identificarlas y aislarlas. Entre ellos se encuentran CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, y moléculas de adhesión como CD106 (molécula de adhesión celular vascular VCAM-1), CD166 (molécula de adhesión celular leucocito activado ALCAM), molécula de adhesión intercelular (ICAM -1). No expresan antígenos de superficie típicos de la HSC como son CD34, CD45 o CD14. (Chamberlain et al. 2007).

A su vez existen una variedad de marcadores diferentes de acuerdo al tejido que origina las MSC. Por ejemplo aquellas que provienen del tejido adiposo expresan CD49d, mientras que las que provienen del resto de los tejidos no poseen dicho marcador (Zuk et al. 2002).

También expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase 1 pero con ausencia en la expresión del antígeno leucocitario humano (HLA) clase 2 de superficie (Le Blanc et al. 2005). Desde el punto de vista inmunológico estas

características otorgan la posibilidad de poder realizar trasplantes alogénicos de MSC sin utilización de inmunosupresión. El MHC clase 1 puede activar los linfocitos T pero en ausencia de moléculas co-estimuladoras una segunda señal no es generada y las células T permanecen anérgicas. Las MSC poseen una propiedad inmunosupresora, ya que por ejemplo, inhiben la maduración, proliferación y diferenciación in vitro de los linfocitos B (Aggarwal et al. 2005).

I.2.6. Aplicación en la investigación clínica

Las MSC poseen la capacidad de adherirse a diferentes tejidos, particularmente tejidos dañados. Grupos de investigación las han estudiado en el infarto agudo de miocardio. Las MSC fueron trasplantadas directamente en el lugar de la lesión y una semana después se objetivó la diferenciación de las mismas en cardiomiocitos, células endoteliales y pericitos (Gojo et al. 2003). El mismo fenómeno ha sido objetivado al administrarse por vía endovenosa en ratas con isquemia cerebral (Mahmood et al. 2003, Chen et al. 2001). Probablemente los tejidos dañados expresen una serie de receptores o ligandos que atraen a las MSC y facilitan su adhesión.

Dentro del sistema nervioso central (SNC), el trasplante de MSC en la medula espinal de ratas parapléjicas, originó la formación de puentes celulares que actuaban como guías para la regeneración de la misma promoviendo de esta forma su recuperación. Probablemente la función de las MSC en el SNC sea la de producir factores de crecimiento y físicos para estimular su regeneración (Hofstetter et al. 2002).

También ha sido demostrado que cuando las MSC son trasplantadas en tejidos fetales y neonatales animales, su capacidad de diferenciación en diferentes tejidos es mayor que en comparación al trasplante en adultos. El estudio de Liechty y colaboradores, en el que trasplantaron MSC en una oveja en gestación, demostró a los 13 meses la diferenciación de dichas células en condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos, tejido tímico y médula ósea. También se encontraron células en hígado, bazo, tejido adiposo, pulmón, cartílago articular y áreas perivasculares del tejido nervioso central (Liechty et al 2000).

Otro grupo de investigación inyectó MSC en los ventrículos laterales de unos ratones de 3 días de vida, examinándolos 12 días después. Encontraron que las MSC migraban a través del cerebro y cerebelo de la misma forma que lo hacen las células progenitoras. Algunas de ellas se diferenciaron en astrocitos y otras en neuronas (Kopen et al. 1999).

Cuando las MSC son administradas por vía endovenosa sufren un atrapamiento a nivel pulmonar (efecto que puede ser mejorado por la administración de nitroprusiato de sodio) (Gao et al. 2001).

En la actualidad se plantean problemas éticos y legales al realizar investigación con embriones y abortos de fetos, lo que ha generado una búsqueda de nuevas fuentes para la obtención de MSC.

I.3. CELULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

I.3.1. Características generales

Las MSC provenientes del tejido adiposo (ASC o ATMSC- adipose tissue-derived stromal cells), fueron aisladas por primera vez en 2002 (Zuk et al. 2002).

Desde entonces se han convertido en una población dentro de las MSC muy utilizada tanto para investigación como para posibles aplicaciones clínicas.

Representan un tejido atractivo para investigadores debido a numerosos factores. El procedimiento quirúrgico para su obtención es sencillo, el acceso subcutáneo es simple y puede ser repetido varias veces, el aislamiento enzimático de ASC resulta poco complicada. Por lo que desde el punto de vista clínico representaría una opción mínimamente invasiva para el paciente (utilizando solamente anestesia local) y una fuente para obtener grandes cantidades si es necesario.

Factores como la edad del donante, tipo de tejido adiposo (ya sea blanco o grasa parda), localización (subcutáneo o visceral), tipo de intervención quirúrgica (liposucción, lipectomía) y las condiciones del cultivo, pueden influir en la capacidad de diferenciación de las ASC (Shi et al. 2005). En el año 1983 se publicó un trabajo que analizaba las diferencias de estas características en ratas macho Sprague-Dawley. Sus resultados objetivaron que de la grasa visceral (en este caso perirrenal)

se obtenía mayor cantidad de adipocitos y que la multiplicación de los mismos era más elevada. También se observó que a mayor edad de los animales este índice disminuía (Djian et al. 1983). Un estudio más reciente en conejos también objetivó que la grasa perivisceral era más eficaz (Peptan et al. 2006). En humanos, un estudio de 2011, comprobó que la grasa proveniente del abdomen bajo conseguía mayor índice de multiplicación, aunque no objetivaron diferencias entre los métodos quirúrgicos (Aguena et al. 2012).

I.3.2. Características fenotípicas

Al ser analizadas por citometría de flujo, se obtuvieron los siguientes marcadores de expresión de las ASC: CD13, CD 14, CD 16, CD 31, CD34, CD44, CD45, CD49d, CD56, CD62E, CD71, CD90, CD104, CD105, CD106, SH3, STRO-1 y –ve (Zuk et al. 2002).

I.3.3. Proceso de diferenciación

La diferenciación de una ASC hacia un linaje celular es un proceso complejo en continua investigación y descubrimiento. Consta de partes que comprenden la proliferación, asignación y diferenciación. En ella intervienen factores de transcripción propios de la célula, una extensa variedad de quinasas celulares, factores de crecimiento y diferentes receptores. Muchos de ellos han sido identificados, pero aún queda por conocer el mecanismo por el cual la célula “decide” asignarse a un linaje particular (Schäffler et al. 2007) (Tabla 1)

Tipo de diferenciación	Factores de diferenciación
Adipogénesis	Insulina, dexametasona, indometacina, rosiglitazona
Condrogénesis	BMP-6, BMP-7, FGF-2, TGF-B, TGF-B2, dexametasona
Osteogénesis	Vit. D, Ac. ascórbico, dexametasona, ac. valproico, BMP-2
Miogénesis	IGF-1, FGF, EGF, HGF
Cardiomogénesis	IL-3, IL-6, SCF
Neurogénesis	Ac. valproico, insulina, hidrocortisona, EGF, FGF
Pancreático/ endocrino	Pentagastrina, nicotinamida, glucosa, HGF
Hepático	HGF, OSM, DMSO

Abreviaturas: BMP: proteína morfogenética de hueso, FGF: factor de crecimiento fibroblástico, TGF: factor de crecimiento transformador, IL: interleuquina, SCF: factor de célula madre, EGF: factor de crecimiento epidermoide, HGF: factor de crecimiento del hepatocito, Ac: ácido, Vit: vitamina, OSM: oncostatina M, DMSO: sulfóxido dimetilo, IGF: factor de crecimiento similar a la insulina.

Diferenciación in vitro.

Osteoblastos: las ASC se incuban con ácido ascórbico, B-glicerofosfato y dexametasona por dos a tres semanas. Al cabo de este periodo, se pueden observar en los cultivos, nódulos o agregados celulares expresando fosfatasa alcalina y en algunos casos también, acumulación de calcio. A su vez se tiñen de manera positiva con Rojo Alizarina y técnica von Kossa.

Adipogénesis: las ASC son incubadas con dexametasona, insulina, isobutil-metil-xantina e indometacina, proliferando hacia preadipocitos. En ellos se puede observar la acumulación de vacuolas lipídicas, teñidas con Aceite Rojo O, como así también la expresión de lipasa lipoproteica, receptor Y2 de activación de la proliferación de peroxisomas y proteína de aP2.

Condrogénesis: las ASC se cultivan en la presencia de factor transformador de crecimiento-B. Su análisis histológico muestra tinción con Azul de Toluidina, indicando la abundancia de glicosaminoglicanos en la matriz extracelular. Las células también producen colágeno tipo II, que es una sustancia típica del cartílago articular.

Miogénesis: las ASC se incuban con Anfotericina B y 5-Azatidina. Las células obtenidas son mioblastos que se fusionan formando miotúbulos multinucleados. Expresan un determinante específico de linaje que es la miosina y un marcador inmunohistoquímico el MyoD1 específico. (Pitinger et al. 1999).

I.3.4. Implicaciones clínicas

Las implicaciones clínicas de las ASC han sido estudiadas desde los comienzos de su descubrimiento. Se han propuesto desde entonces numerosas posibles aplicaciones médicas: tanto en ingeniería de tejidos como en terapia génica. Muchas de ellas han sido estudiadas in vitro e in vivo en animales. Algunas han dado el gran salto y han podido aplicarse en seres humanos.

Sin embargo todavía quedan dificultades por soslayar que son el objetivo de grupos de investigación en la actualidad (Tabla 2).

De acuerdo a la línea celular en la cual se diferencian, las aplicaciones clínicas estudiadas hasta el momento son:

Adipogénesis: reconstrucción de mama post resección quirúrgica por tumor, defectos del tejido adiposo subcutáneo post-trauma, cirugía o quemadura. Enfermedad de Crohn y tratamiento de fistulas (García-Olmo et al. 2005).

Condrogénesis: reparación de cartílago en defectos de articulaciones y discos, cirugía plástica de nariz (Mochizuki et al. 2006).

Osteogénesis: regeneración esquelética de defectos óseos congénitos, post-trauma o tumor (Peterson et al. 2005).

Miogénesis: distrofias musculares, reconstrucción de defectos post-traumáticos o quirúrgicos (Di Rocco et al. 2006).

Cardiomiogénesis: regeneración del músculo cardíaco, mejora funcional post-infarto agudo de miocardio (Rodríguez et al. 2005).

Vascular/endotelial: neovascularización, enfermedades isquémicas (Planat-Benard et al. 2004).

Neurogénesis: lesión cerebral, ictus, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrofica, esclerosis múltiple, lesión de nervio periférico (Nishio et al. 2006, Kizuhara et al 2008, Sugaya et al. 2008, Burns et al. 2009, Kao et al. 2008, Barnabé-Heider et al. 2008, Mazzini et al. 2008).

Pancreático/endócrino: diabetes mellitus tipo 1 (Timper et al. 2006).

Hepático: insuficiencia hepática crónica, regeneración hepática, trasplante hepático (Kim et al. 2003).

Hematopoyético: enfermedad por injerto contra huésped (Fang et al. 2006).

Tabla 2. Aplicaciones clínicas de las ASC	(de Zuk, 2010)
	Referencias
ASC en investigación	

Tejido adiposo	Mauney <i>et al.</i> , 2007
Tejido óseo	Cowan <i>et al.</i> , 2004; Dudas <i>et al.</i> , 2006; Yoon <i>et al.</i> , 2007
Cartílago	Dragoo <i>et al.</i> , 2003; Guilak <i>et al.</i> , 2004
Musculo esquelético	Bacou <i>et al.</i> , 2004; Goudenege <i>et al.</i> , 2009
Musculo liso	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
Neuronas	Ashjian, 2003; Safford <i>et al.</i> , 2004; Erba <i>et al.</i> , 2009
Cuerdas vocales / laringe	Kumai <i>et al.</i> , 2009; Long <i>et al.</i> , 2009
Vejiga/ uretra	Jack <i>et al.</i> , 2005
Tejido vascular y cardiovascular	Miranville <i>et al.</i> , 2004; Heydarkhan-Hagvall <i>et al.</i> , 2008;
Tejido hematopoyético	Cousin, 2003; Puissant <i>et al.</i> , 2005
Páncreas	Timper <i>et al.</i> , 2006; Okura <i>et al.</i> , 2009a
Hígado	Seo <i>et al.</i> , 2005; Banas <i>et al.</i> , 2007; Okura <i>et al.</i> , 2009b
Tejido epitelial	Brzoska <i>et al.</i> , 2005; Jeong, 2009
Tejido epitelio-tubular de riñón	Li <i>et al.</i> , 2009
ASC en enfermedad	
Reparación de discos intervertebrales	Hsu <i>et al.</i> , 2008
Lesión de medula espinal	Ryu <i>et al.</i> , 2009
Regeneración de nervio periférico	di Summa <i>et al.</i> , 2009
Glioblastoma	Josiah <i>et al.</i> , 2010
Huntington	Lee <i>et al.</i> , 2009
Esclerosis múltiple	Riordan <i>et al.</i> , 2009
Ictus	Kim <i>et al.</i> , 2007
Incontinencia urinaria	Lin <i>et al.</i> , 2010
Disfunción eréctil	Lin <i>et al.</i> , 2009a
Liver repair	Liang <i>et al.</i> , 2009
Diabetes	Lin <i>et al.</i> , 2009b
Colitis	Gonzalez-Rey <i>et al.</i> , 2009
Isquemia	Kondo <i>et al.</i> , 2009
Artritis reumatoide	González-Rey <i>et al.</i> , 2010
Envejecimiento	Park <i>et al.</i> , 2008
Regeneración de la piel	Trottier <i>et al.</i> , 2008
Paladar hendido	Conejero <i>et al.</i> , 2006
Reparación de tendones	Uysal and Mizuno, 2009
ASC ensayos en humanos	
Defectos de la calota	Lendeckel <i>et al.</i> , 2004
Enfermedad de Crohn	García-Olmo <i>et al.</i> , 2009; Taxonera <i>et al.</i> , 2009
Incontinencia urinaria	Yamamoto <i>et al.</i> , 2009
Enfermedad por injerto contra huésped	Fang <i>et al.</i> , 2007

II. OBJETIVOS

1. Obtener, mediante cultivos y subcultivos, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
2. Describir e identificar la morfología de las células en cultivo.
3. Cuantificar el crecimiento de dichos cultivos.

III. MATERIAL Y METODOS

Materiales

Se tomaron ratas Wistar adultas, hembras, con peso entre 200 y 300 gr y, edades de 4 y 5 meses; para la obtención de células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo subcutáneo.

El cuidado y la manipulación de los animales se realizaron según la directiva de la Unión Europea 2010/63/EU y del Estado Español (RD1201/2005).

Materiales utilizados en el proceso de extracción de tejido adiposo:

1. Anestésicos, en inyección intraperitoneal, preparada con una mezcla de 80% de Imalgene (Ketalar (50mg/ml, Pfizer ref. 631028) y 20% de Xilacina (Rompun 2% Bayer Health Care ref. 011302103).
2. Material quirúrgico estéril e implementos de quirófano.
3. Microscopio Optomic.

Materiales utilizados en el procesamiento, digestión, obtención de células de tejido adiposo y mantenimiento de los cultivos:

1. Reactivos: medios de cultivo: Leivobitz L15 (5220) Sigma Aldrich, Dulbecco's Modified Eagle Medium (6046) (Sigma Aldrich), Colagenasa tipo II extraída de *Costridium Histolyticum* y liofilizada (ref. 17101-015 Gibco), Tripsina (1800 Unit/mg, Sigma ref. T-7409), Antibiotico-antimicótico: 1000 Unit/ml de penicilina G sódica, 1000 Ug/ml de estreptomina y 25 Ug/ml de anfotericina B (Gibco), Suero Bovino Fetal (ref.9665 Sigma-Aldrich), Cloruro de Amonio, solución de Azul Tripán y Solución de Hank.
2. Materiales de laboratorio: placas de cultivo (Falcon ref. 353001, diámetro 35 x 10 mm). Frascos de polipropileno (Falcon ref. 352006, diámetro 17 x 100 mm). Tubos (Falcon ref. 352005). Copa de disociación de 85 ml con malla.
3. Equipos de laboratorio de cultivos: Centrifuga 5702 Eppendorf (Huoca-Erloss), Baño María (Trade Raipa), Campana de flujo laminar de seguridad biológica (Hera Safe Heraeus), Estufa (Hera Safe Heraeus).

Materiales utilizados para lavado, fijación y tinción de las células:

1. Paraformaldehído tamponado al 4% (PFT)
Se prepara de la siguiente manera:

Se añaden 40 gramos de paraformaldehído en polvo (Pancreat ref. 141451) y 0.01 g de NaOH (Pancreat ref. 131687) a 400 ml de agua destilada.

Se calienta y mantiene en agitación hasta que se diluya completamente y la solución se ponga transparente a no más de 60° C.

Se deja enfriar o se enfría con hielo.

Se añaden 250 ml de tampón fosfato 0,4 M y se completa hasta un litro de agua destilada.

2. Solución de Hank

Se prepara de la siguiente manera:

Se disuelven en agua destilada, con agitación, los siguientes reactivos:

KCl (0.4 g^l⁻¹), NaCl (8.0 g^l⁻¹), KH₂PO₄ (0.06 g^l⁻¹), NH₂ HPO₄ (0.048 g^l⁻¹), NaHCO₃ (Merk ref. 6329, 0.35 g^l⁻¹), EDTA (Acido etilendiaminotetracético, Pancreat ref. 131026, 0.2 g^l⁻¹).

Se ajusta el pH con HCl o NaOH 1N hasta el intervalo 7.0-7.2.

Se filtra (filtro de 0,2 Um) para obtener un producto "estéril".

3. Solución Tripsina

Se disuelven con agitación 0.5 g^l⁻¹ de tripsina en solución de Hank.

Se filtra (filtro de 0,2 Um) para obtener un producto "estéril".

4. Solución Azul Tripán (Merk ref. 11732)

Se disuelven Azul Tripán en una disolución de sal de Hank a razón de 0.5 g^l⁻¹.

5. Solución de Giemsa (al 20%)

Materiales usados para inmunohistoquímica:

1. Anticuerpos primarios: CD 105. Se prepara diluyéndolo en PBS-Triton al 0.2%, se agrega suero de cabra al 5% (Sigma ref. G9023).
2. Diamidino-2-phenylindol (DAPI) de Sigma Aldrich.
3. Anticuerpos secundarios: Policlonal anti IgG de raton marcado con fluoroforo rojo (Alexa fluor 594), obtenido de cabra 10 Ug/ml (invirogen molecular probes ref. A 11032). Policlonal anti IgG de conejo marcado con fluoroforo verde (Alexa fluor 488), obtenido de cabra 10 Ug/ml, diluido lo anterior en PBS.

Materiales usados para la observación y contaje de células, toma de fotografías y evaluación de pruebas de inmunohistoquímicas:

1. Cámara de Neubauer.
2. Microscopio invertido (Zeiss Axiovert 25).

3. Microscopio de contraste de fase (Microscopio Nikon Eclipse TE 300 con cámara fotográfica digital Nikon DXM 1200).
4. Cámara fotográfica digital Nikon DXM 1200.
5. Microscopio de Fluorescencia (Zeiss Axiophot) con cámara digital (RT color dianosis instruments ing.).

Materiales utilizados para congelación de las células:

1. Medio de congelación: Freezing Medium-DMSO1 (Sigma-Aldrich ref. C6164).
2. Vial de congelación: Cryovial Sterile 1,2 ml (Simport Beloeil QC ref. T310-1A).
3. Contenedor de congelación: Cryo 1°C Freezing Container (Thermo Fisher Scientific Inc. Ref. 5100-0001).
4. Congelador: Herafreeze (Thermo Fisher Scientific Inc. Ref. HFU686).

Método.

Las ratas se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal (1.5 ml por kilo de peso de una solución de Ketamina al 80% - Xilacina al 20%), posterior a lo cual se practicó una incisión, en la piel de la región inguinal, de unos dos a tres centímetros. Mediante una cuidadosa disección y en condiciones de asepsia, se extrajo tejido adiposo (0,22 gr – 0,67 gr respectivamente) que fue colocado en un placa de cultivo conteniendo medio de Leibovitz con antibiótico-antimicótico al 1%. Se retiraron restos de otros tejidos y se troceó el tejido adiposo en pequeñas partes, llevando el mismo a una nueva placa con el mismo medio. Para la digestión enzimática se incubó durante 60 minutos en una solución conteniendo 5 ml de Leibovitz y colagenasa tipo I al 0.075% a 37°C. Esta mezcla fue pasada por un filtro de 60 µm para separar el tejido no disociado. Luego, la colagenasa fue neutralizada mediante la adición de DMEM (conteniendo 10% de Suero Bovino Fetal- SBF) y se centrifugó a 1200 rpm durante 10

minutos. El sedimento fue resuspendido en una solución de cloruro de amonio y dejado, diez minutos en este medio. Después de ello se volvió a centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos. El nuevo sedimento se resuspendió en DMEM y se sembró en placas de 35 mm de diámetro a una densidad de 100.000 células por mililitro: colocando 1ml por placa y completando el volumen hasta 3 ml con el mismo medio.

Las placas se incubaron durante 30 minutos en una estufa a 37° C con 5% de CO₂ y saturación de humedad. Posteriormente se retiraron de la estufa, se quitó el medio de las placas para separar las células no adherentes y, se agregaron a cada placa, nuevamente 2 ml de medio DMEM con antibiótico al 1% y SBF al 10%. Se llevaron las placas a la incubadora manteniendo iguales condiciones de presión, temperatura y saturación de CO₂ antes descriptas. Los cultivos fueron cambiados cada dos días y mantenidos hasta la subconfluencia.

Subcultivo de ASC.

Cuando las ASC se aproximaron a la confluencia, ocupando al menos un 80% de la superficie del cultivo, se subcultivaron. Para ello, se eliminó de cada placa el medio de cultivo y, se lavaron las células con solución de Hank. Luego, se adicionó una solución de Tripsina retirándola a los pocos segundos y esperando unos minutos a que las células se desprendieran. A continuación, se añadió DMEM más antibiótico y SBF a cada placa, para neutralizar el efecto de la enzima. Se extrajeron y se llevaron a un tubo, que se centrifugó a 2000 rpm durante dos minutos. Posteriormente se resuspendió el sedimento en un mililitro de medio y se realizó el recuento celular utilizando Azul Tripán. Se sembraron en proporción de 200.000 células por placa de cultivo agregando dos mililitros de DMEM por placa. Se llevaron las placas a una estufa a 37° C con 5% de CO₂ y saturación de humedad y se cambiaron los medios de cultivo cada dos días. Cuando estos subcultivos alcanzaron nuevamente la subconfluencia se traspasaron mediante el mismo procedimiento y se estudió el número de células obtenidas a lo largo de nueve semanas.

Tinción de cultivos celulares.

De las placas que se encontraban listas para subcultivar se seleccionaron algunas para teñir. Primero se retiró el medio de cultivo y se añadió dos mililitros de PBS. Se dejó actuar durante treinta segundos y se retiró. Se agregaron dos mililitros de PFT

durante diez minutos y luego se desecho. Luego, se añadieron nuevamente dos mililitros de PBS dejando actuar treinta segundos y se retiró. Se repitió este último paso dos veces más. Posteriormente se colocaron dos mililitros de Giemsa filtrada al 20% durante treinta minutos y se retiró. Se añadieron dos mililitros de PBS, dejando actuar treinta segundos y luego, se desecho, repitiendo hasta que el PBS dejó de estar coloreado.

Congelación de ASC.

Posterior a realizar el conteo celular se decidió, según el número de células obtenidas, a la congelación de las mismas en una proporción de un millón de células por vial de congelación. Se colocó el tubo con las células restantes y se centrifugó durante dos minutos a 2000 rpm. Se añadió un mililitro de medio de congelación y se resuspendió. Posteriormente se colocó en un vial de congelación que se introdujo en un contenedor de congelación que se llevó a un congelador a -80 °C. A las 24 horas se retiró el vial del contenedor colocándolo en el mismo congelador en una caja apropiada.

Inmunohistoquímica

Se lavaron las placas con PBS y se fijaron con PFT durante treinta minutos. Se retiró y se lavó nuevamente con PBS, tres veces, durante cinco minutos cada vez. A continuación se inmunobloquearon con suero de cabra al 0.5%. Se aplicó anti-CD 105 y se dejó actuar durante 24 horas a 4°C. Se retiró el anticuerpo y se lavó con PBS, tres veces durante cinco minutos. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario y se lavó nuevamente con PBS, tres veces durante cinco minutos. Se aplicó DAPI para teñir los núcleos, se dejó actuar por diez minutos en la oscuridad, se retiró y se lavó nuevamente con PBS, tres veces durante cinco minutos.

Las placas de cultivo fueron estudiadas y fotografiadas a 10 y 20 aumentos. La identificación de las ASC se hizo por la morfología (placas con tinción con Giemsa) y por la inmunohistoquímica o fenotipo (placas con marcador anti-CD 105). Se realizó a su vez el conteo diferencial, tomando cuatro campos diferentes de una misma placa para determinar la pureza del cultivo.

IV. RESULTADOS

ESTUDIO MORFOLOGICO DE CULTIVOS

En las placas sembradas con células madre de tejido adiposo, según la lectura expuesta anteriormente, se observaron células con apariencia de fibroblastos que se

adherían al plástico y crecían agrupadas. Su morfología era variada. Poseían núcleos grandes de forma redondeada u ovalada con nucléolos bien teñidos. Su citoplasma mostraba salientes por medio de las cuales hacían contacto entre ellas (Figs 1 y 2). Algunas de las células demostraron ser CD105 positivas, por lo que fueron consideradas como ASC (Figs 3 y 4).

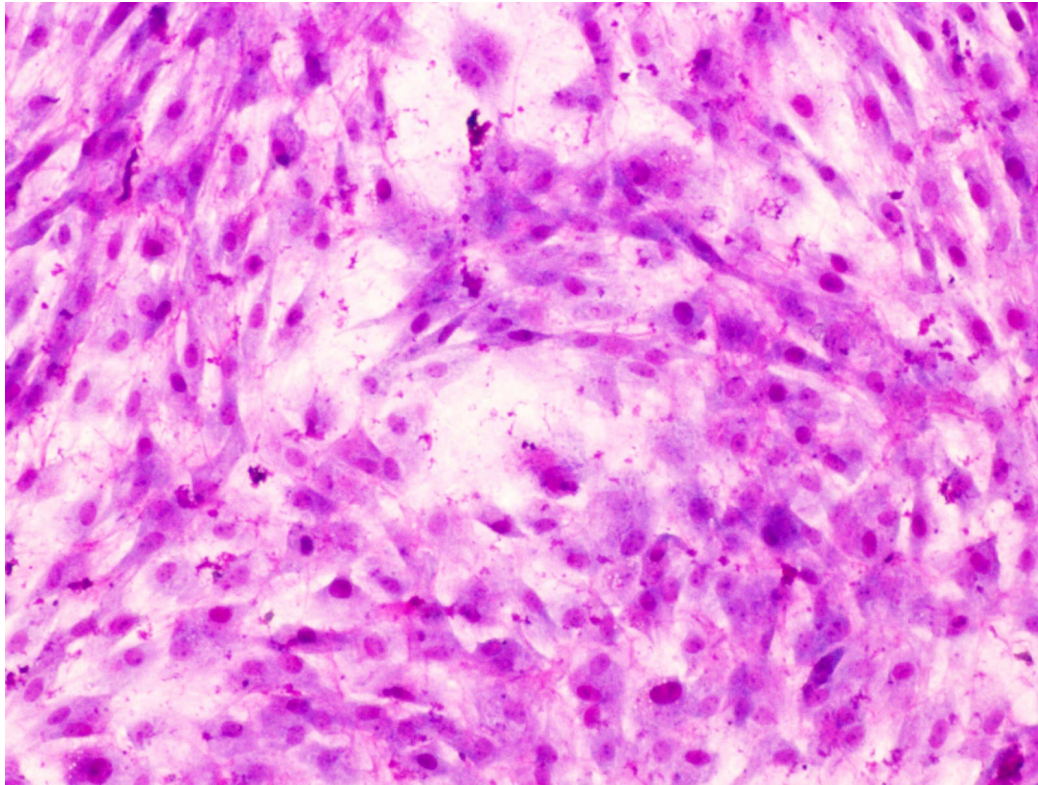


Figura 1. Células en cultivo procedentes de tejido adiposo de rata, teñidas con Giemsa, donde se observa la subconfluencia celular. 10x

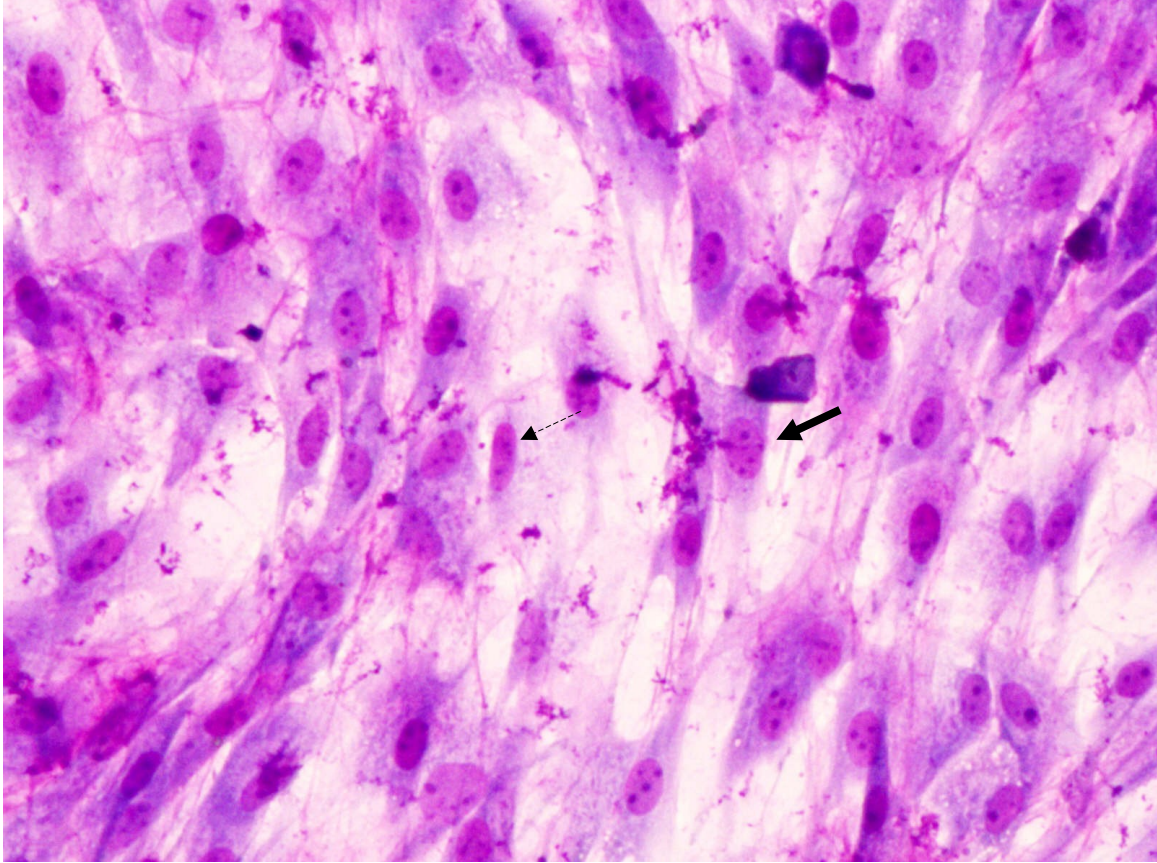


Figura 2. Células en cultivo procedentes de tejido adiposo de rata, teñidas con Giemsa. Las ASC se muestran con núcleos redondeados y nucléolos prominentes (flecha continua). Otras células alargadas y fusiformes de aspecto fibroblástico y células intermedias (flecha discontinua). 20x

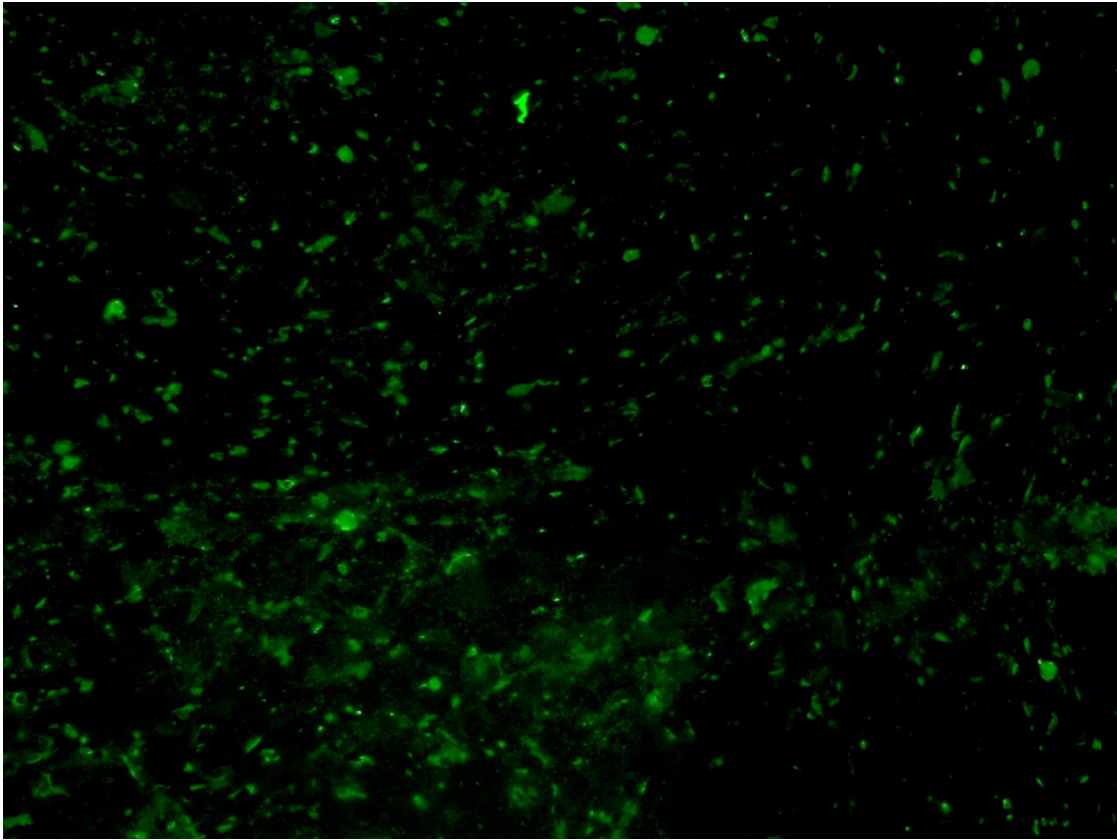


Figura 3. Cultivo de ASC marcadas mostrando positividad a CD 105. 10x

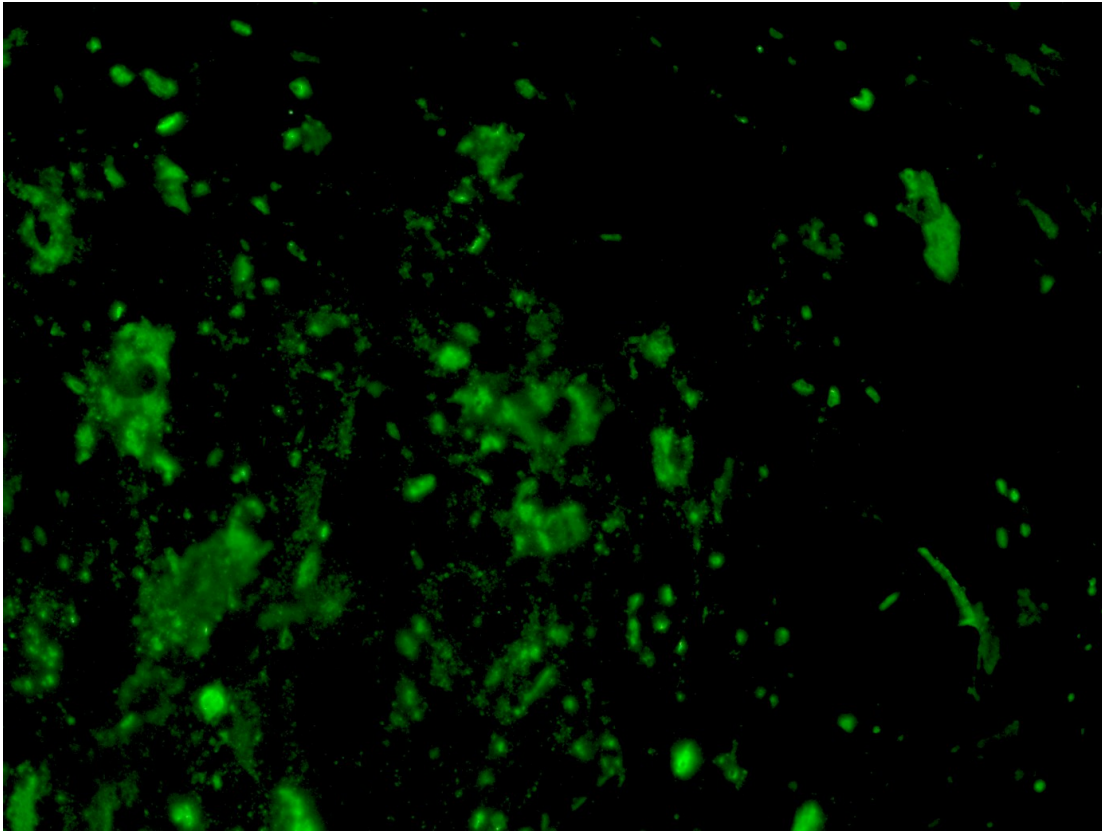
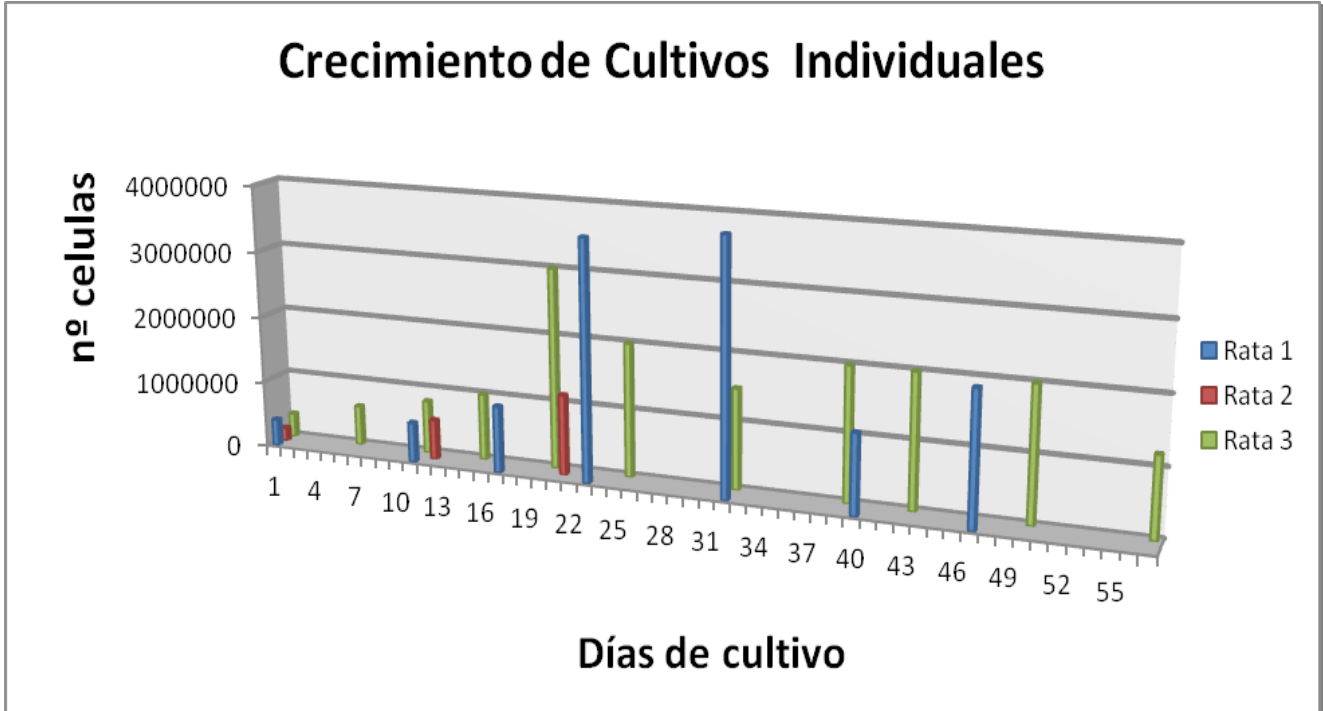


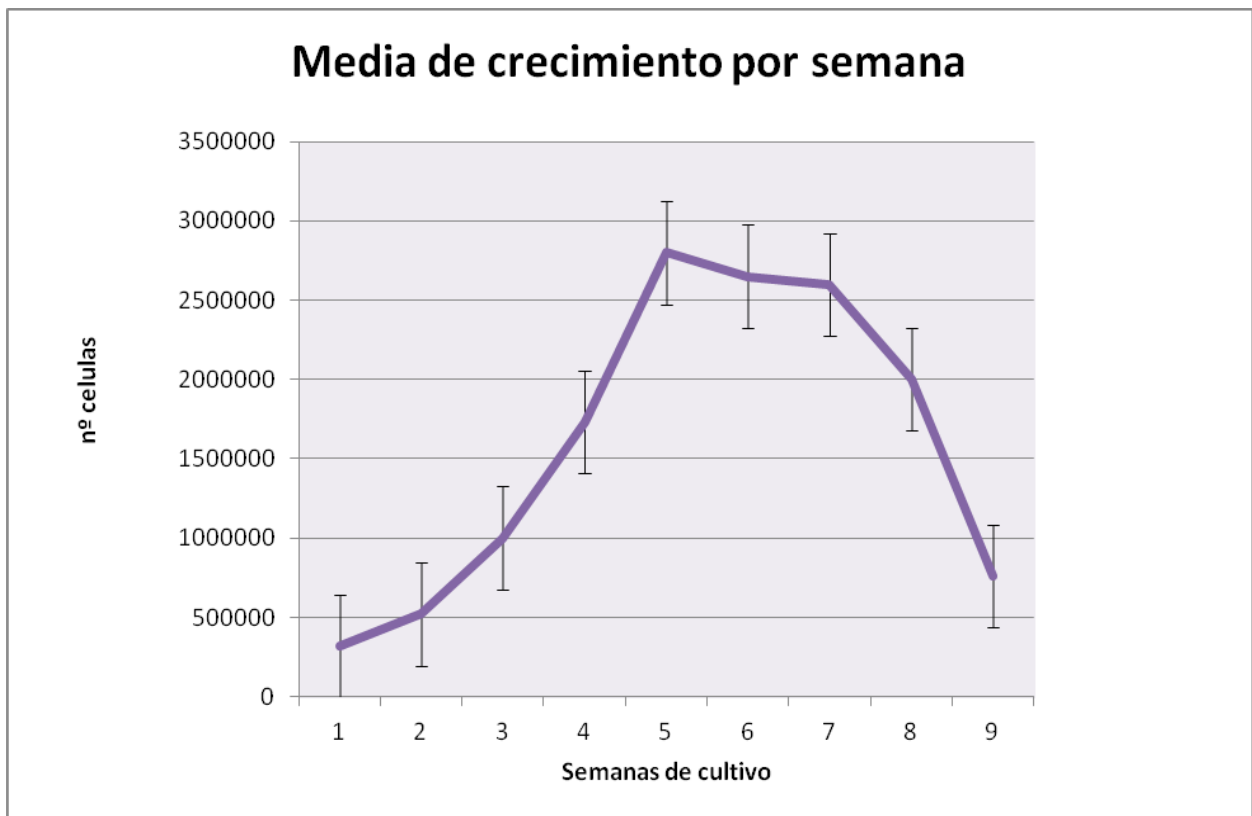
Figura 4. ASC marcadas con anti CD 105, donde se visualiza su citoplasma teñido en verde. 20x

Los datos del crecimiento de cultivos celulares individualmente según fue la rata 1, la rata 2 y la rata 3, se presentan en la gráfica 1. De la rata 1 se obtuvieron el mayor número de células, con un pico de 3.800.000 entre los días 22 y 31. De la rata 2 el crecimiento fue progresivo pero solo pudo analizarse hasta el día 22, ya que posteriormente las placas de cultivo fueron contaminadas con hongos y por lo tanto, desechadas. De la rata 3 se obtuvo un crecimiento constante y parejo, el pico fue también hacia el día 22 con 3.000.000 de células.



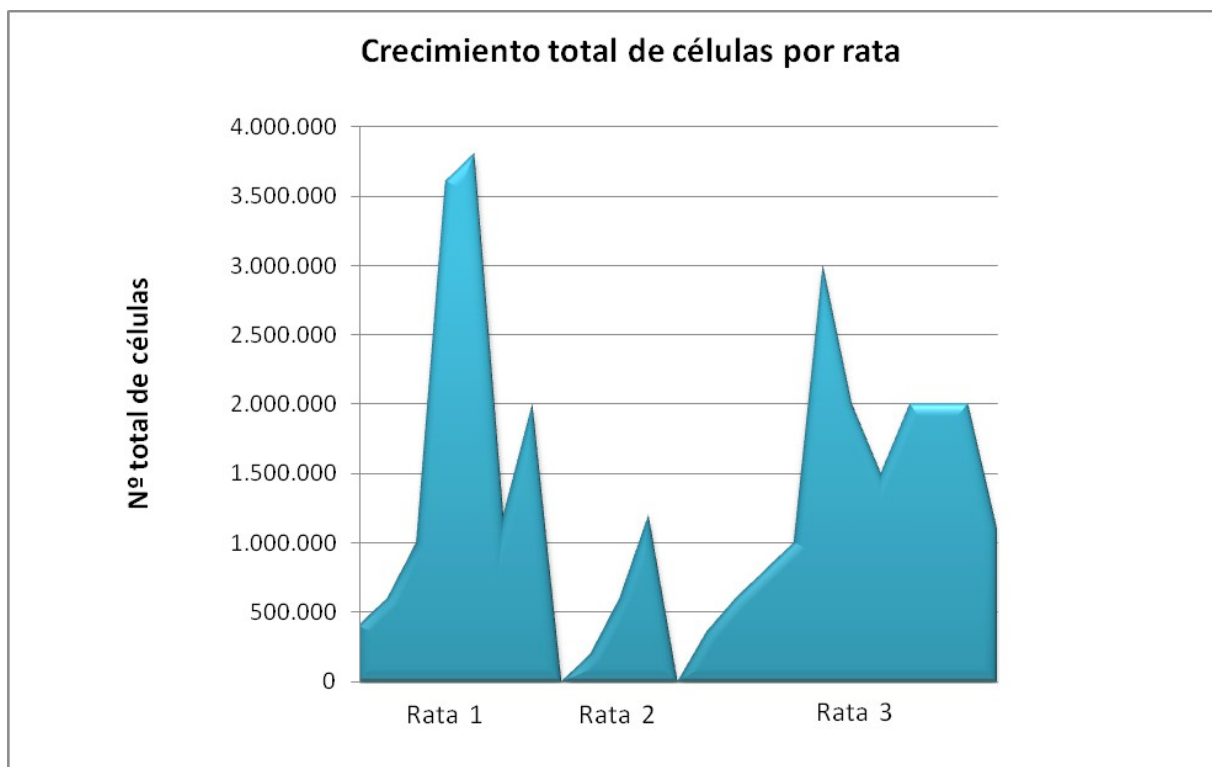
Gráfica 1

Cuando se analizó la media de crecimiento por semana (teniendo en cuenta el número total de células de las tres ratas), pudo observarse que el crecimiento de las células fue progresivo hasta la quinta semana en donde tuvo su mayor pico. De este punto en adelante se produjo un descenso que duró hasta la novena semana en que concluimos el estudio (Gráfica 2).



Gráfica 2

Cuando se analizó el número total de células por rata se obtuvo una dinámica del crecimiento de los cultivos semejante en los tres casos, hasta lógicamente el final de cada cultivo que, por las razones anteriormente mencionadas tuvo lugar en diferentes momentos del estudio. Se observó a su vez, una duración más prolongada en la rata 3. Por otra parte también, el mayor número de células lo encontramos en la rata 1 (Gráfica 3).



Gráfica 3

El análisis de la media del crecimiento de las células en cultivo por placa sembrada mostró que en las primeras semanas del estudio, éste fue homogéneo (aproximadamente en 500.000 por placa), con un pico en la quinta semana, posterior al cual, el número de células en cultivo por placa sembrada fue disminuyendo de forma gradual y paulatina (Gráfica 4).



Gráfico 4

V. DISCUSION

En nuestro estudio pudimos objetivar que, siguiendo el procedimiento para la obtención de células madre del tejido adiposo, las células en cultivo muestran una característica morfológica similar a las ASC encontradas y descritas por otros autores (Kitagawa et al 2006).

El número de células totales obtenidas en nuestro estudio mostró a lo largo de las semanas un crecimiento exponencial, hasta la semana 5^o, estabilizándose durante las siguientes dos semanas para luego ir decayendo hasta la semana 9^o en la que concluimos el estudio. No obstante, realizada la comparación por semanas del número de células producidas por placa, se obtuvo un crecimiento homogéneo durante las primeras cuatro semanas para mostrar un pico proliferativo en la semana 5^o y posteriormente disminuir de manera progresiva. El crecimiento exponencial observado durante la primer mitad del estudio pensamos que pudiera ser debido a la lógica expansión de los cultivos al ser subcultivadas en diferentes placas, hasta llegar a un punto en que dicha expansión se estabiliza. Por su parte el decrecimiento observado en la última fase del estudio podía deberse a inhibiciones entre las células y el envejecimiento del cultivo que conlleva a una menor tasa de proliferación.

En cuanto al número de ASC, nuestra metodología nos permitió obtener una alta pureza, pues los datos hallados se situaban en torno al 71%. Estos resultados se encuentran en concordancia también con los de otros autores, por lo que se constata y corrobora la validez de dicho método para la obtención y proliferación de ASC provenientes de tejido adiposo (Tholpady et al 2003).

Desde el punto de vista de la aplicabilidad clínica, las ASC obtenidas de tejido adiposo presentan numerosas ventajas ya que pueden ser obtenidas de manera rápida, sencilla y en grandes cantidades si es necesario. De dicho tejido se consiguen un gran número de ASC en comparación a las obtenidas de médula ósea, ya que por ejemplo a partir de un gramo de tejido adiposo se ha logrado producir 5×10^3 de ASC, una cantidad 500 veces mayor que el número de células madre extraídas de un gramo de médula ósea (Fraser et al 2006).

La capacidad de diferenciación en distintos tipos celulares (de las tres capas embrionarias) ha sido demostrada en diferentes estudios, ampliando de esa forma el campo de aplicación y otorgando la posibilidad de que las ASC puedan ser utilizadas en patologías que afecten a diferentes tejidos.

Otro aspecto importante son sus características inmunitarias que las convierten en la opción más beneficiosa para el huésped en comparación al resto de las SC.

Las ASC son células madre adultas que pueden ser obtenidas en cualquier momento de la vida de una persona permitiendo de esa forma evitar las controversias éticas que puedan surgir con respecto a la obtención de SC de otros tejidos.

Uno de los mayores retos planteados desde su descubrimiento es el tratamiento de enfermedades que hasta el momento actual son consideradas incurables y de las que, a su vez, el tratamiento que se dispone puede llegar a ser en ocasiones muy limitado. Entre ellas patologías neurodegenerativas, enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrofica, Esclerosis Múltiple; patologías congénitas como Parálisis Cerebral; entre otras, representan un abanico de posibilidades en las que la utilización de ASC podrían dar origen a nuevas ventanas terapéuticas.

VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo en N° de células de ASC por placa de 500.000 durante las primeras semanas del estudio.
2. A partir de la séptima semana los cultivos parecen mostrar una clara disminución de su tasa de proliferación.
3. La pureza que se obtuvo fue del 71%.

VII. BIBLIOGRAFIA

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 105: 1815–1822.

Aguena M, Dalto Fanganiello R, Lorico Tissiani LA, Andr e Ishiy FA, Atique R, Alonso N, Passos-Bueno MR. Optimization of Parameters for a More Efficient Use of Adipose-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine Therapies. *Stem Cells International*. 2012.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol*. 1966; 126: 337-89.

Altman J, Das GD. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*. 1965; 207: 953- 956.

Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, Fogh J. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. *Lab. Invest*. 1984; 50: 147-162.

Andrews PW. Human teratocarcinomas. *Biochim. Biophys. Acta* 1988; 948, 17-36.

Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2002; 159: 123-34.

Ashton BA, Allen TD, Howlett CR et al. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*. 1980; 151: 294 – 307.

Bab I, Ashton BA, Gazit D et al. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci*. 1986; 84: 139 –151.

Barnab -Heider F, Fris n J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 16-24.

Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: A critical review. *J Comp Neurol*. 2009; 515: 125-144.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; 98: 2396 –2402.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980; 56: 289 –301.

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*. 2007; 25: 2739–2749.

Chen J, Li Y, Wang L et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001; 32: 1005–1011.

Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000; 288: 1660-3.

Cohnheim J. "Über Entzündung und Eiterung," *Virchows Archiv A: Pathology. Pathologische Anatomievol.* 1867; 40: 1–79.

Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A et al. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 2006; 119: 2945–2952.

Djian P, Roncari DAK, and Hollenberg CH. Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 1200-1208.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8: 315–317.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 198; 292:154- 156.

Fang B, Song YP, Liao LM et al. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 38: 389 –390.

Fraser J, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MF. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006; 24: 150-154.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976; 4: 267–274.

Gao J, Dennis JE, Muzic RF et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169: 12–20.

Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005; 48: 1416 –1423.

Garrido Colino C. Estado actual de la investigación con células madre. *An Pediatr*. 2003; 59: 552-8.

Gojo S, Gojo N, Takeda Y et al. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2003; 288: 51–59.

Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 2199 –2204.

In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003; 102: 1548 –1549.

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

Kao CH, Chen SH, Chio CC, Lin MT. Human umbilical cord blood-derived CD34+ cells may attenuate spinal cord injury by stimulating vascular endothelial and neurotrophic factors. *Shock*. 2008; 29: 49-55.

Kim DH, Je CM, Sin JY et al. Effect of partial hepatectomy on in vivo engraftment after intravenous administration of human adipose tissue stromal cells in mouse. *Microsurgery*. 2003; 23: 424–431.

Kitagawa Y, Korobi M, Toriyama K, Kamei Y, Torii S. History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical applications. *Jpn J Plast Reconstr Surg*. 2006; 49: 1097-1469.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 10711–10716.

Kuzuhara S. Treatment of Parkinson's disease at present and in the future. *Rinsho Shinkeigaku*. 2008; 48: 835-843.

Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11: 321–334.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6:1282–1286.

Mahmood A, Lu D, Lu M et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*. 2003; 53: 697–702.

Maximov A. El linfocito como una célula madre común de los elementos diferentes de sangre en el desarrollo embrionario y en el hígado de los mamíferos postfetalen. *Folia Haematol*. 1909; 8: 125-141.

Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, et al. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci*. 2008; 265: 78- 83.

Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y et al. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: Distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 843–853.

Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP et al. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res.* 1991; 195: 492–503.

Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Yoshinaga K, et al. The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. *J Neurosurg Spine.* 2006; 5: 424-433.

Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117: 1462–1470.

Peterson B, Zhang J, Iglesias R et al. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng.* 2005; 11: 120 –129.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143–147.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004; 109: 656–663.

Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med.* 2005; 201: 1397–1405.

Schäffler A, Büchler C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells -Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells.* 2007; 25: 818–827.

Shi YY, Nacamuli RP, Salim A et al. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 2005; 116: 1686 – 1696.

Siminovitch L, McCulloch EA y Till JE. The distribution of colonyforming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol.* 1963; 62: 327-336.

Sugaya K, Merchant S. How to approach Alzheimer’s disease therapy using stem cell technologies. *J Alzheimers Dis.* 2008; 15: 241-254.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent Stem Cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 1-14.

Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *The Anatomical Record.* 2003. Part A; 272: 398–402.

Thomson JA et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282: 1145–1147.

Timper K, Seboek D, Eberhardt M et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 341: 1135–1140.

Weissman IL. Stem Cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000; 100: 157–168.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 387-403.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000; 61: 364 –370.

Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Hideyuki Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007; 327: 449–462.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 4279–4295.

Zuk PA. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. *Molecular Biology of the Cell*. 2010; 21: 1783–1787.