

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



ugr

Universidad
de **Granada**

TESIS DOCTORAL

***“Aislamiento y caracterización de células madre /
progenitoras y tumorales humanas: potencial
terapéutico e implicaciones en carcinogénesis”***

Memoria presentada por D. Manuel Picón Ruiz para optar al grado
de Doctor Internacional por la Universidad de Granada.

Granada, Noviembre 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Jesús Álvarez
D.L.: 00000-0000
ISBN: 00000-0000

El doctorando D. Manuel Picón Ruiz y los directores de la tesis el Dr. Juan Antonio Marchal Corrales y la Dra. Macarena Perán Quesada garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 23 de Octubre de 2012.

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

El trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, ha sido realizado por el licenciado D. MANUEL PICÓN RUIZ, durante los años 2007-2012 bajo la dirección de:

Dr. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES

Dra. MACARENA PERÁN QUESADA

Parte de este trabajo ha sido subvencionado por la Junta de Andalucía a través del programa de incentivos para la formación de personal docente e investigador predoctoral en áreas de conocimiento deficitarias (FPDI) de la convocatoria de 2009, por el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria) a través del proyecto nº. PI10/02295; y por el Vicerrectorado de Política Científica e Investigación de la Universidad de Granada a través del subprograma GREIB TRANSLATIONAL PROJECTS convocatoria 2010 (GREIB.PT_2010_09).

Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados o están en fase de publicación en las siguientes revistas: Stem Cells and Development 2012, 21(4): 562-574; Cell Stem Cell; EMBO Molecular Medicine; y Cancer Discovery.

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D. Manuel Picón Ruiz ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Tesis Doctoral: “***Aislamiento y caracterización de células madre / progenitoras y tumorales humanas: potencial terapéutico e implicaciones en carcinogénesis***” durante los años 2007-2012 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Internacional ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 23 de Octubre de 2012.

Fdo. Juan Antonio Marchal Corrales

Dña. MACARENA PERÁN QUESADA PROFESORA TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

HACE CONSTAR:

Que D. Manuel Picón Ruiz ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Tesis Doctoral: "***Aislamiento y caracterización de células madre / progenitoras y tumorales humanas: potencial terapéutico e implicaciones en carcinogénesis***" durante los años 2007-2012 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Internacional ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 23 de Octubre de 2012.

Fdo. Macarena Perán Quesada

A mis padres y hermana, por su apoyo incondicional y su inestimable ayuda cada día de mi vida y porque es un orgullo para mí brindarles esta Tesis que es tan suya como mía.

A toda mi familia, los que aún están compartiendo este camino que es la vida conmigo y a aquellos que ya no están, pero que siempre vivirán en mis recuerdos.

A Cynthia, porque sin tu apoyo diario y comprensión este trabajo nunca hubiese sido posible.

A todos mis amigos y personas importantes en mi vida que han compartido una parte de su tiempo junto a mí y me han dejado momentos inolvidables en mi memoria.

A todos vosotros gracias.

.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, D. Juan Antonio Marchal Corrales y Dña. Macarena Perán Quesada, por su apoyo científico y personal que ha sobrepasado lo estrictamente profesional.

Me gustaría agradecer especialmente a la Dra. Joyce M. Slingerland, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio en la Universidad de Miami, donde fueron obtenidos muchos de los resultados que se muestran en este trabajo, y por haber sido una fuente de motivación para mi trabajo por su infinita sabiduría y su capacidad de sacrificio por la investigación.

Me gustaría también expresar mi agradecimiento a D. Pablo Menéndez Buján y Dña. Clara Bueno Uroz por instruirme en diversas técnicas de laboratorio que han permitido la realización de esta tesis y me han formado como científico.

También quiero agradecer a distintas personas que por unos u otros motivos han hecho posible la realización de esta tesis: Roque Hidalgo, Jaime Lazuén, Carmen Huertas, Manuela Expósito, etc.

Además, me gustaría expresar mi agradecimiento a diferentes personas que me han acompañado en diferentes momentos de mi vida, y que han dejado una huella en mí imborrable, entre los que se encuentran:

- Mis amigos de Málaga: Carlos, Juan, Trabalón, Jesús y Mercedes, Avelino, Rubén, Adri, Paco, Rafa, Juanín, Lalo, Conde, Jesús, Cártama, Patri, etc., que aún en la distancia han permanecido a mi lado, disfrutando de buenos momentos y apoyándome en los malos.

- Mis compañeros de “sufrimiento” en el laboratorio Cynthia, Mariang, Alberto, Gema, Ester, Elena, Blanca, Ana y a otros que han compartido momentos de trabajo y diversión conmigo durante mi paso por Granada: Aitor, Ángela, Alex, Ruth, Milán, Xabi, Maribel, Santi y un largo etcétera; especialmente Toni y Juandi, ya sabéis que habéis sido mi “pequeña familia” aquí.

- Mis compañeros de esos partidos de fútbol semanales, siempre recordaré esos goles que marqué y esas carreras sin aliento de estos años.

- Y un largo etcétera que, aunque haya olvidado nombrar personalmente en estas páginas, saben que son imprescindibles para mí.

NOTA

A lo largo del texto se utilizarán las abreviaturas de los términos en inglés debido al uso extendido de dicha lengua en publicaciones científicas y al uso de abreviaturas de manera cotidiana en el lenguaje científico. Muchos de los acrónimos en inglés son de uso general en ciencia, por lo que para simplificar el texto se mantendrán las abreviaturas en inglés. Al final del texto se incluye un glosario en el que se detalla su significado.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.”

Albert Einstein

(1879-1955)

ÍNDICE

ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. CÉLULAS MADRE / PROGENITORAS.....	7
1.1. BREVE HISTORIA DE LAS CÉLULAS MADRE.....	7
1.2. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CÉLULAS MADRE / PROGENITORAS.....	9
1.3. TIPOS.....	10
1.3.1. Clasificación en función de su potencial de diferenciación.....	10
1.3.2. Clasificación basada en su origen.....	12
1.4. PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE.....	18
2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	19
2.1. CARACTERÍSTICAS.....	19
2.2. FUENTES DE OBTENCIÓN.....	23
2.3. DIFERENCIACIÓN.....	26
2.3.1. Plasticidad de las células madre mesenquimales.....	26
2.3.2. Diferenciación cardiaca.....	27
2.3.3. Diferenciación vascular.....	28
3. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES.....	30
3.1. CARACTERÍSTICAS.....	30
3.2. NEOVASCULARIZACIÓN POSTNATAL.....	34
3.2.1. Homeostasis vascular.....	35
3.2.2. Vascularización tumoral.....	37
4. TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA.....	39
4.1. BREVE HISTORIA.....	39
4.2. DEFINICIÓN.....	40
4.3. APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE.....	42

4.4.	ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	44
4.4.1.	Generalidades.....	44
4.4.2.	Cardiopatía isquémica.....	47
4.4.3.	Enfermedades cerebrovasculares.....	49
4.4.4.	Insuficiencia cardíaca.....	51
4.4.5.	Enfermedades vasculares periféricas.....	53
4.5.	USO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	54
5.	CÁNCER.....	58
5.1.	DEFINICIÓN.....	58
5.2.	EPIDEMIOLOGÍA.....	59
5.3.	ETIOLOGÍA.....	61
5.4.	CARCINOGENÉISIS.....	65
5.4.1.	Mantenimiento de la señalización proliferativa.....	68
5.4.2.	Evasión de los mecanismos supresores del crecimiento.....	69
5.4.3.	Resistencia a la muerte celular.....	71
5.4.4.	Inmortalidad replicativa.....	72
5.4.5.	Inducción de la angiogénesis.....	73
5.4.6.	Activación de su capacidad de invasión y metástasis.....	74
5.4.7.	Otras características de las células cancerosas.....	76
5.5.	TEORÍAS SOBRE LA HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL.....	78
5.5.1.	Modelo estocástico.....	78
5.5.2.	Modelo de las células madre cancerígenas.....	78
5.6.	TEORÍAS SOBRE LA HETEROGENEIDAD INTERTUMORAL.....	80
5.6.1.	Modelo mutacional.....	80
5.6.2.	Modelo de la célula de origen.....	81
6.	TIPOS DE CÁNCER.....	83
6.1.	CLASIFICACIÓN GENERAL.....	83

6.2.	CÁNCER DE MAMA.....	84
6.2.1.	Incidencia y mortalidad.....	84
6.2.2.	Etiología.....	85
6.2.3.	Subtipos.....	87
6.2.4.	Posible origen de los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama.....	90
6.3.	CÁNCER COLORRECTAL.....	93
6.3.1.	Incidencia y mortalidad.....	93
6.3.2.	Etiología.....	94
6.3.3.	Subtipos.....	95
6.3.4.	Posible origen de los diferentes subtipos de cáncer colorrectal.....	98
7.	CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS.....	100
7.1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	100
7.1.1.	Similitudes con las células madre no tumorales.....	100
7.1.2.	Auto-renovación y pluripotencia en las células madre cancerígenas.....	103
7.2.	IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS.....	108
7.2.1.	Aislamiento y caracterización.....	108
7.2.2.	Marcadores específicos de células madre cancerígenas de mama.....	112
7.2.3.	Marcadores específicos de células madre cancerígenas de colon.....	115
7.3.	VALOR PRONÓSTICO.....	117
7.4.	TERAPIAS SELECTIVAS FRENTE A LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS.....	119
	HYPOTHESIS.....	123
	OBJECTIVES.....	129

MATERIAL Y MÉTODOS.....	133
1. CULTIVOS CELULARES.....	135
1.1. LÍNEAS CELULARES.....	135
1.2. CONDICIONES DE CULTIVO.....	135
1.3. CONTEO CELULAR.....	137
1.4. CONGELACIÓN CELULAR.....	138
1.5. DESCONGELACIÓN CELULAR.....	139
2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE / PROGENITORAS.....	139
2.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO.....	139
2.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MULTIPOTENTES DE TIPO ENDOTELIAL.....	140
2.3. DIFERENCIACIÓN CARDIACA DE CÉLULAS MULTIPOTENTES DE TIPO ENDOTELIAL.....	142
3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS.....	144
3.1. SEPARACIÓN CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	144
3.1.1. Basado en la expresión de marcadores de superficie.....	144
3.1.2. Basado en la actividad aldehído deshidrogenasa.....	145
3.2. SEPARACIÓN CELULAR EN BASE A LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN.....	147
4. ENRIQUECIMIENTO DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS.....	148
4.1. TRATAMIENTO CON CITOQUINAS.....	148
4.2. EXPOSICIÓN AL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR.....	149

5.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	150
5.1.	ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	150
5.2.	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	151
5.2.1.	Estudio de la expresión de marcadores de superficie.....	151
5.2.2.	Determinación de la expresión de proteínas citoplasmáticas.....	153
5.3.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	155
5.3.1.	Extracción del RNA total.....	155
5.3.2.	Cuantificación del RNA.....	157
5.3.3.	Determinación de la integridad del RNA.....	157
5.3.4.	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa.....	158
5.3.5.	Electroforesis en gel de agarosa.....	159
5.4.	INMUNOFLUORESCENCIA.....	161
5.5.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT.....	163
5.5.1.	Extracción de proteínas.....	163
5.5.2.	Cuantificación de proteínas.....	164
5.5.3.	Electroforesis.....	164
5.5.4.	Transferencia.....	166
5.5.5.	Bloqueo y marcaje con anticuerpos.....	167
5.5.6.	Revelado.....	168
6.	ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR.....	168
6.1.	MEDIANTE TINCIÓN CON BROMODESOXIURIDINA / YODURO DE PROPIDIO.....	168
6.2.	MEDIANTE TINCIÓN CON HOECHST 33342.....	170
7.	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL.....	171
7.1.	ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO.....	171

7.2.	ENSAYOS DE FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS DE TIPO CAPILAR.....	172
7.3.	ENZIMA-INMUNOENSAYO.....	173
7.4.	ENSAYOS DE MIGRACIÓN.....	175
7.5.	CAPACIDAD DE EXCLUSIÓN DE HOECHST 33342.....	177
7.6.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ALDEHÍDO DESHIDROGENASA.....	177
7.7.	CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESFERAS.....	178
	7.7.1. Ensayo de formación de esferas.....	178
	7.7.2. Ensayo de dilución límite.....	179
7.8.	ENSAYO DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO.....	180
7.9.	ENSAYOS DE TUMORIGÉNESIS <i>IN VIVO</i>	181
	7.9.1. Estudios con células tumorales de colon.....	181
	7.9.2. Estudios con células tumorales de mama.....	181
8.	RESISTENCIA DIFERENCIAL A FÁRMACOS DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS.....	182
8.1.	EFFECTO DE AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS.....	182
8.2.	EFFECTO DE INHIBIDORES DE LA γ -SECRETASA.....	183
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	183
	RESULTS.....	185
1.	CHARACTERIZATION OF hASC ISOLATED FROM LIPOASPIRATES..	187
	1.1. ADHERENCE TO PLASTIC.....	187
	1.2. SPECIFIC SURFACE ANTIGEN EXPRESSION.....	188
	1.3. MULTIPOTENT DIFFERENTIATION POTENTIAL.....	189
2.	ISOLATION AND EXPANSION OF ME-LC FROM hASC CULTURES.....	190
	2.1. EVOLUTION OF THE CELL CULTURES.....	190

2.2.	IMMUNOPHENOTYPE VARIATIONS.....	190
2.3.	GENE EXPRESSION PROFILE AT DIFFERENT STAGES.....	194
2.4.	ANGIOGENESIS ASSAY <i>IN VITRO</i>	195
2.5.	SDF-1 LEVELS IN SUPERNATANTS OF CELLULAR CULTURES.....	195
2.5.1.	SDF-1 secretion by cells cultured at different stages.....	195
2.5.2.	Influence of endothelial growth factors on SDF-1 secretion by ME-LC in an ECM model.....	197
2.6.	CAPACITY OF ME-LC TO MIGRATE TOWARD ANGIOGENIC CYTOKINES.....	198
3.	CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION POTENTIAL OF ME-LC.....	199
3.1.	EFFECT OF 5-AZA IN THE CELLULAR MORPHOLOGY.....	199
3.2.	CARDIAC MARKERS DETERMINATION ON ME-LC TREATED WITH 5 –AZA.....	201
3.2.1.	Immunofluorescence staining.....	201
3.2.2.	Flow cytometry determination.....	203
4.	ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CSC FROM BREAST AND COLON CANCER CELL LINES BY FACS.....	204
4.1.	CELL ISOLATION FROM THE MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINE BASED ON CD44 AND CD24 EXPRESSION.....	204
4.1.1.	Characterization of the MDA-MB-231 breast cancer cell line.....	204
4.1.2.	Isolation of CD44 ⁺ /CD24 ^{neg} and CD44 ⁺ /CD24 ^{low+} subpopulations.....	205
4.1.3.	Capacity to recapitulate the initial heterogeneity.....	206
4.1.4.	Mammosphere and colony-formation assays.....	208
4.2.	CELL ISOLATION FROM THE T-84 HUMAN COLON CANCER CELL LINE BASED ON ALDH ACTIVITY.....	208
4.2.1.	Sorter for low and high ALDH activity.....	211
4.2.2.	Characterization of cells by flow cytometry.....	212

5.	ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CSC FROM BREAST AND COLON CANCER CELL LINES BY DIFFERENTIAL ADHESION....	214
5.1.	CELL ISOLATION FROM THE MCF-7 BREAST CANCER CELL LINE BASED ON DIFFERENTIAL ADHESION.....	214
5.1.1.	Cell surface markers expression.....	214
5.1.2.	Study of the side population fraction.....	215
5.1.3.	Limiting dilution assay.....	216
5.2.	CELL ISOLATION FROM T-84 COLON CANCER CELL LINE BASED ON DIFFERENTIAL ADHESION.....	217
5.2.1.	ALDH activity.....	217
5.2.2.	Tumorigenic potential of trypsin-sensitive T-84 cells.....	218
5.2.3.	Reestablishment of tumour heterogeneity.....	219
5.3.	CELL ISOLATION FROM THE HT-29 COLON CANCER CELL LINE BASED ON DIFFERENTIAL ADHESION.....	220
5.3.1.	Cell surface markers expression.....	220
5.3.2.	ALDH activity.....	222
6.	ROLE OF CYTOKINES IN THE ENRICHMENT OF CSC IN BREAST CANCER	222
6.1.	TREATMENT WITH PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES.....	222
6.1.1.	Variations in the proportion of CD44 ⁺ /CD24 ^{low+} cells.....	222
6.1.2.	Effect of cytokines in proliferation and the cell cycle.....	223
6.1.3.	ALDH activity in MDA-MB-231 cells exposed to cytokines...	227
6.1.4.	Effect of cytokines in Notch pathway activation and c-MYC and SOX2 expression.....	227
6.1.5.	Mammosphere and colony-formation assays on MDA-MB-231 cells exposed to cytokines.....	229
6.2.	EXPOSITION TO VEGF.....	231
6.2.1.	Variations in the proportion of CD44 ⁺ /CD24 ^{low+} cells.....	231
6.2.2.	Effect of VEGF in proliferation and the cell cycle.....	232
6.2.3.	ALDH activity in MDA-MB-231 cells exposed to VEGF.....	233

6.2.4. Mammosphere and colony-formation assays on MDA-MB-231 cells exposed to VEGF.....	233
6.2.5. <i>In vivo</i> tumorigenesis assay.....	236
7. EFFECT OF PACLITAXEL AND γ-SECRETASE INHIBITION ON BCSC.....	237
7.1. TREATMENT OF MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS WITH PACLITAXEL.....	237
7.1.1. Cell death induced by Paclitaxel.....	237
7.1.2. Differential resistance of CD44 ⁺ /CD24 ^{neg} and CD44 ⁺ /CD24 ^{low+} cells to paclitaxel.....	238
7.2. TREATMENT OF MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS WITH DAPT.....	241
7.2.1. Inhibition of the Notch pathway and SOX2 expression in MDA-MB-231 cells exposed to DAPT.....	241
7.2.2. Differential effect of DAPT on CD44 ⁺ /CD24 ^{neg} and CD44 ⁺ /CD24 ^{low+} cells.....	243
DISCUSSION.....	247
CONCLUSIONS.....	267
BIBLIOGRAPHY.....	271
GLOSSARY.....	327
APPENDIX.....	337

ABSTRACT

Stem cells (SC) and cancer stem cells (CSC) represent two cellular populations that share many similarities but, at the same time, are very different. Both are capable to long-term self-renewal and differentiation; however, their biological functions are totally opposite. SC are involved in tissue homeostasis and regeneration, representing a potent therapeutic tool for regenerative medicine. On the other hand, CSC are related with cancer progression and metastasis, being responsible of resistance to anti-cancer treatment and cancer recurrence. Hence, the correct isolation and characterization of these cell populations is essential and may have important clinical implications.

Endothelial progenitor cells (EPC) represent a relatively rare cell population, and expansion of sufficient cell numbers remains a challenge. Here we proposed a simplified and efficient method to obtain multipotent endothelial-like cells (ME-LC) from human adipose-derived stem cells (hASC) by a serial of culture stages. ME-LC population displayed increased expression levels of endothelial and hematopoietic lineage markers but no signs of mature endothelial cell differentiation. ME-LC formed capillary-like structures *in vitro*, secreted increased levels of stromal derived factor-1 (SDF-1), and showed ability to migrate attracted by pro-angiogenic cytokines. Importantly, ME-LC retain the capacity to proliferate extensively and differentiate into cardiomyocyte-like cells. This methodology could represent a new useful approach for cell-based therapies in cardiovascular regenerative medicine.

In this study we present an extensive evaluation of different methodologies developed to isolate and characterize CSC in two cancer cell models. Cell isolation based on specific cell surface markers expression, high aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity and/or low adherence to plastic surface were used to isolate CSC from breast (BCSC) and colon cancer (CCSC) cell lines. We selected CSC subpopulations with high tumour markers expression, increased self-renewal, clonogenicity ability, and/or enhanced tumorigenic potential *in vivo*. Isolated breast CD44⁺/CD24^{low+} cells showed a phenotype more characteristic of stem cell-like than CD44⁺/CD24^{neg}. In addition, we demonstrated the role of different microenvironmental factors such as pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines in the acquisition of stem cell-like properties. Finally, we evaluated the effect of conventional and CSC-target therapies showing that strategies targeting Notch pathway by inhibition γ -secretase activity have been shown more effective for BCSC treatment than conventional therapies based in the use of Paclitaxel.

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS MADRE / PROGENITORAS

1.1. BREVE HISTORIA DE LAS CÉLULAS MADRE

El término células madre (del inglés “stem cells”, SC) data de 1868, año en que el zoólogo alemán Ernst Haeckel definió a los organismos unicelulares, o protozoos, que él creía que eran los antepasados filogenéticos de los organismos multicelulares, como “Stammzellen” (Haeckel, 1868). A finales del siglo XIX este término fue introducido en embriología por August Weismann en su teoría de la continuidad del plasma germinal (Weismann, 1885), y posteriormente utilizado para definir a las células derivadas del óvulo fecundado que eran capaces de dar lugar tanto a células germinales primordiales como a células somáticas primordiales, atribuyendo a las SC la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse mediante divisiones asimétricas (Boveri, 1892; Haecker, 1892). Por otra parte, Artur Pappenheim fue el primero en utilizar el término “Stammzellen” para describir a la célula precursora capaz de generar tanto las células blancas como las rojas de la sangre (Pappenheim, 1896). A principios del siglo XX se estableció este término para definir a una hipotética célula precursora de las diferentes que constituyen el sistema hematopoyético (Dantschakoff, 1908; Maximow, 1908; Neumann, 1912), habiendo sugerido Neumann varias décadas antes que la médula ósea era el sitio en el cual se formaban los componentes de la sangre en humanos y otros mamíferos (Neumann, 1868).

Aunque la aparición del término SC en la bibliografía científica se remonta a finales del siglo XIX, realmente no fue hasta mediados del siglo XX cuando comenzaron los primeros avances en el campo de las SC, propiciados por los ensayos de fecundación *in vitro*, que llevaron a finales de los años 60 a la fecundación de ovocitos humanos y a postular su posible aplicación clínica y científica (Edwards et al., 1969), consiguiéndose en el año 1978 el nacimiento del primer ser humano mediante la implantación de un embrión obtenido por fecundación *in vitro* (Steptoe and Edwards, 1978). Cabe destacar los estudios realizados por Tarkowski y Mintz a principios de los años 60, que demostraron que la fusión de embriones de células genéticamente distintas resultaba en la formación de quimeras adultas (Mintz, 1964; Tarkowski, 1961).

Otros estudios de gran relevancia realizados en estos años fueron las investigaciones sobre el trasplante de médula ósea para la reconstitución del tejido sanguíneo. Varias décadas antes se había demostrado el efecto nocivo de la radiación en las poblaciones de SC que originan las células sanguíneas (Sabin et al., 1932). Diferentes investigaciones demostraron que la administración en ratones de células de médula ósea, aisladas previamente a la exposición a altas dosis de radiación, permitía la reconstitución de los componentes de la sangre (Ford et al., 1956; Lorenz and Congdon, 1954). En el año 1958 se llevó a cabo con éxito el primer trasplante alogénico de médula ósea en humanos para tratar a varios trabajadores de una central nuclear que habían estado expuestos a una dosis subletal de radiación tras un accidente (Mathe et al., 1959). Uno de los hitos más importantes en el campo de las SC, se debe a los estudios sobre la hematopoyesis de Till y McCulloch, entre otros, en los cuales se demostraba definitivamente la existencia de células madre hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea con capacidad de auto-renovación (Becker et al., 1963; Till and McCulloch, 1961; Till et al., 1964).

También cabe destacar los estudios realizados por Stevens sobre la biología de los teratocarcinomas de ratón, en los que identificó la existencia de diferentes tipos celulares y demostró la capacidad de las células de los teratomas para formar cuerpos de tipo embrionario al ser transplantados en el abdomen de ratones, así como la capacidad de ciertos tejidos embrionarios y óvulos fecundados para formar teratomas y teratocarcinomas al ser implantados en el testículo del ratón (Stevens, 1960; Stevens, 1962; Stevens, 1964; Stevens, 1968). Del mismo modo, los estudios de Kleinsmith y Pierce demostraron la naturaleza multipotente de las células de carcinoma embrionario (Kleinsmith and Pierce, 1964). Estos trabajos, por un lado, evidenciaron la capacidad de las células de carcinoma embrionario para generar diferentes tipos celulares somáticos derivados de las tres líneas germinales así como células indiferenciadas, y por otro, permitieron el desarrollo de técnicas de cultivo para su mantenimiento *in vitro*. Estos estudios fueron el prelude para derivar líneas de células pluripotentes de embriones tempranos.

Pero es realmente en 1981 cuando comienza la verdadera revolución de las SC, al lograrse por primera vez el aislamiento y cultivo de células madre embrionarias (ESC) obtenidas a partir de la masa celular interna (ICM) del blastocisto de ratón (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), sentando las bases metodológicas que

condujeron a James Thomson y cols. en 1998 al establecimiento de la primera línea celular de ESC humana (Thomson et al., 1998). Recientemente, el avance en la investigación de las SC y la identificación de los principales genes implicados en el mantenimiento de las características de estas células ha permitido la generación de células pluripotentes de características similares a las ESC a partir de células diferenciadas somáticas humanas mediante la sobre-expresión heteróloga de determinados factores de transcripción, siendo denominadas como células madre pluripotentes inducidas (iPS) (Takahashi et al., 2007).

1.2. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CÉLULAS MADRE / PROGENITORAS

Las SC son células que están presentes en todos los organismos multicelulares y que se definen originariamente como células indiferenciadas con capacidad ilimitada de auto-renovación, a lo largo de toda la vida del individuo, y que pueden diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares (Hall and Watt, 1989; Morrison et al., 1997). Por otro lado, el término célula progenitora se emplea para aquellas células que están ya comprometidas a diferenciarse hacia un número reducido de linajes celulares, siendo consideradas por lo tanto como intermediarias entre las SC y las células diferenciadas (Steindler, 2007). Actualmente se mantiene esta definición simplificada del concepto de SC, aunque las últimas investigaciones sobre estas células ha llevado a la caracterización de las SC como las únicas células que mantienen un equilibrio entre quiescencia, migración, proliferación y diferenciación en función de factores extrínsecos e intrínsecos (Florian and Geiger, 2010).

Las SC tienen la capacidad de sufrir diferentes tipos de división que aseguran su auto-renovación (Figura 1): i) las divisiones simétricas originan dos células hijas idénticas que mantienen las propiedades de las SC, y ocurren particularmente cuando dichas células están en expansión durante el desarrollo o después de una lesión para actuar como reservorio ante distintas necesidades fisiológicas del organismo; ii) mientras que las divisiones asimétricas dan lugar a una única SC, perpetuándose esta célula indiferenciada, y una célula progenitora con una capacidad de auto-renovación limitada, que puede sufrir varios ciclos de división celular antes de diferenciarse en un determinado tipo celular maduro (Morrison and Kimble, 2006). Existe un equilibrio

entre ambos tipos de división modulado por señales extrínsecas e intrínsecas (Florian and Geiger, 2010; O'Brien et al., 2011).

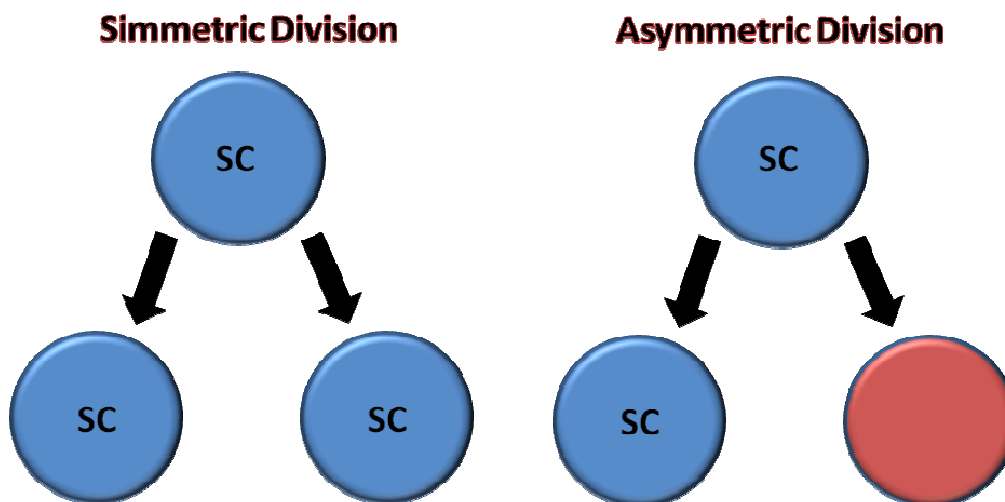


Figura 1. División simétrica y asimétrica de las células madre (SC)

Por otro lado, otra de las principales características de las SC es su capacidad para diferenciarse a multitud de tipos celulares presentes en el organismo, así pues, cuando son sometidas a determinados estímulos extracelulares abandonan su estado indiferenciado y son capaces de diferenciarse en un fenotipo celular específico. Este proceso está complejamente regulado por diferentes rutas de señalización que modulan la auto-renovación y diferenciación de las SC, tales como las rutas Wnt (Kirstetter et al., 2006), Notch (Rock et al., 2011), Hedgehog (Hh) (Ingham and McMahon, 2001), del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (James et al., 2005), de las MAP quinasas y quinasas reguladas por señales extracelulares mediada por la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGF/ERK MAPK) (Dvorak et al., 2005) o Hippo (Lian et al., 2010), entre otras.

1.3. TIPOS

1.3.1. CLASIFICACIÓN EN FUNCIÓN DE SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN

A lo largo del proceso de diferenciación, las SC van perdiendo su capacidad de generar distintos tipos celulares y ganando una función especializada, hasta alcanzar

un estado diferenciado específico en un proceso denominado determinación (Sell, 2004). Según el potencial de diferenciación las SC se clasifican en: totipotentes u omnipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes (Ilic and Polak, 2011).

Células Madre Totipotentes

Las SC totipotentes u omnipotentes pueden diferenciarse en tejidos embrionarios de las tres capas germinales, es decir, ectodermo, mesodermo y endodermo, así como en los tejidos extraembrionarios como el amnios, el alantoides, el saco vitelino, la placenta y el corion, y son capaces de generar un organismo completo y viable. El cigoto ha sido considerado generalmente como la única célula totipotente (Ilic and Polak, 2011; Sell, 2004), aunque estudios recientes indican que la totipotencia del cigoto se mantiene en los blastómeros hasta alcanzarse el estadio de mórula de 8-16 células (Kießling et al., 2009).

Células Madre Pluripotentes

Estas células tienen un potencial más reducido, ya que no pueden generar los tejidos extraembrionarios y por lo tanto no son capaces de originar un individuo completo, pero pueden auto-renovarse y diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales a partir de las cuales se desarrollan todos los tejidos y órganos del individuo. Las ESC son actualmente las únicas células madre pluripotentes naturales conocidas, aunque también se incluyen en este grupo las células iPS que, como su nombre indica, son pluripotentes, pero representan una categoría aparte ya que son producidas por el hombre mediante la reprogramación de células diferenciadas somáticas y no de forma natural (Ilic and Polak, 2011).

Células Madre Multipotentes

Las SC multipotentes pueden auto-renovarse y diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares de una familia de células relacionadas pertenecientes a su capa o linaje embrionario de origen (Behr et al., 2010; Ilic and Polak, 2011). Las células madre mesenquimales (MSC) son un ejemplo típico de células multipotentes,

ya que son células mesodérmicas no especializadas que tienen la capacidad de generar tejido conectivo, hueso, cartílago y los sistemas circulatorio y linfático (Ilic and Polak, 2011).

Células Madre Oligopotentes

Estas SC se caracterizan por estar comprometidas a diferenciarse a unos pocos tipos celulares estrechamente relacionados (Ilic and Polak, 2011). Las células progenitoras mieloides y linfoides pueden ser consideradas un tipo de SC oligopotentes ya que sólo pueden diferenciarse en un subconjunto de células de una familia particular (Ji et al., 2010), o las SC que se localizan en la superficie ocular de los mamíferos, donde participan activamente en la constante renovación de la córnea diferenciándose a células corneales y conjuntivales (Majo et al., 2008).

Células Madre Unipotentes

Las SC unipotentes son aquellas que mantienen la capacidad de auto-renovación pero sólo pueden diferenciarse en un tipo celular concreto, siendo un ejemplo de este grupo las células madre musculares (Ilic and Polak, 2011) o las células madre mioepiteliales y lumbinales que en condiciones fisiológicas sólo se diferencian a estos linajes celulares específicos de la glándula mamaria (Van Keymeulen et al., 2011).

1.3.2. CLASIFICACIÓN BASADA EN SU ORIGEN

Desde un punto de vista ontogenético, las SC pueden clasificarse en cinco grupos diferentes: embrionarias, fetales, perinatales, adultas o iPS (Ilic and Polak, 2011).

Células Madre Embrionarias

Las ESC se derivan de la ICM del blastocisto y se caracterizan por su habilidad para auto-renovarse y dar lugar a todos los tejidos y tipos celulares del organismo adulto, es decir, por ser células pluripotentes (Barrero and Izpisua Belmonte, 2011);

Odorico et al., 2001). Tras la fecundación del óvulo por el espermatozoide se forma el cigoto, que comienza a sufrir una serie de divisiones originando los blastómeros que van perdiendo la totipotencia del cigoto debido a la compactación de los mismos y a las divisiones asimétricas que estas células sufren (Chen et al., 2010). En la fase de blastocisto se produce la diferenciación de dos linajes celulares distintos que exhiben diferencias morfológicas y moleculares (Figura 2): i) el trofoblasto o trofoectodermo, que posteriormente da lugar a los tejidos extraembrionarios como la placenta, ii) y la ICM, que se compone de células pluripotentes que originan las tres capas germinales embrionarias durante el desarrollo (Ilic and Polak, 2011; Nichols and Smith, 2011).

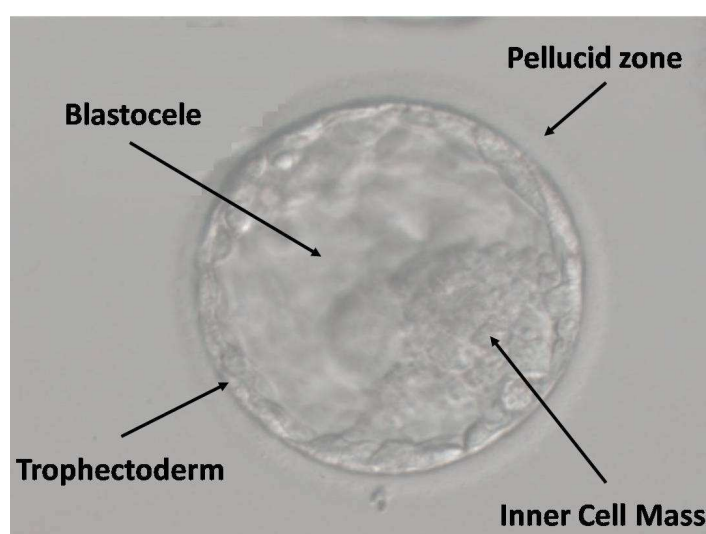


Figura 2. Estructura del blastocisto (Imagen tomada del archivo fotográfico del Banco Andaluz de Células Madre)

En 1998, James Thomson y cols. describieron un método para el mantenimiento *in vitro* de ESC derivadas de la masa celular interna de blastocistos humanos, mediante su cultivo sobre fibroblastos embrionarios de ratón, denominándose a esta capa de células alimentadoras como “feeder-layer” (Thomson et al., 1998). Este hito científico supuso el descubrimiento de una nueva herramienta biomédica con gran aplicabilidad en el “screening” de nuevos fármacos, en el estudio del desarrollo humano, como modelo de desarrollo de enfermedades o para regeneración tisular (Menendez et al., 2006). Hasta la actualidad cientos de líneas de ESC han sido derivadas a partir de blastocistos humanos e incluso ha sido posible su aislamiento de blastómeros obtenidos de la fase de mórula (Chung et al., 2008; Klimanskaya et al., 2006; Strelchenko et al., 2004).

Respecto a su utilización en medicina regenerativa, estas células presentan algunos inconvenientes que limitan su empleo terapéutico, entre otros, su limitada accesibilidad, el riesgo de formación de teratomas principalmente al utilizarlas en un estado indiferenciado, la dificultad de obtener células diferenciadas a un linaje celular puro, el rechazo post-transplante al tratarse de un transplante alogénico o el riesgo derivado del empleo de fuentes animales para su cultivo (Behr et al., 2010; Brunt et al., 2012; Polak and Bishop, 2006). En relación a este último aspecto, diversos grupos de investigación han enfocado sus estudios en el perfeccionamiento de métodos de cultivo para el mantenimiento de ESC sin la necesidad de emplear material de fuentes animales para permitir su posible uso terapéutico. Algunas de las estrategias desarrolladas han sido el uso de “feeder-layer” de origen humano (Lee et al., 2012; Richards et al., 2002; Wang et al., 2005), el empleo de cultivos libres de “feeder” (Gerecht et al., 2007; Swistowski et al., 2009; Van Hoof et al., 2008; Xu et al., 2001), y el desarrollo de medios de cultivo definidos que sólo contienen proteínas recombinantes humanas (Chiao et al., 2008; Liu et al., 2006; Lu et al., 2006; Ludwig et al., 2006).

Células Madre Fetales

Son células con menor potencial de diferenciación que las ESC y que están presentes durante el desarrollo fetal. Estas SC procedentes del feto, son obtenidas de embarazos interrumpidos, y su aislamiento y utilización depende de las regulaciones de cada país. Actualmente, la mayoría de las líneas de SC neuronales disponibles tienen este origen, y algunas están siendo utilizadas en ensayos clínicos e incluso en pacientes (Ilic and Polak, 2011). También han sido identificadas poblaciones de MSC en distintos tejidos prenatales durante el primer trimestre de embarazo como la sangre, el hígado o la médula ósea (Campagnoli et al., 2001), y también durante el segundo trimestre en órganos como el bazo, el pulmón (in 't Anker et al., 2003a), el páncreas (Hu et al., 2003) o el timo (Rzhaninova et al., 2005), entre otros. Se ha observado que estas MSC tienen una mayor capacidad de proliferación *in vitro* que las obtenidas de tejidos perinatales y adultos, y además muestran un menor nivel de expresión de antígenos leucocitarios humanos (HLA), por lo que muestran menor riesgo de inmunogenicidad, siendo mejores candidatas para su aplicación en transplantes alogénicos (Zhang et al., 2009).

Células Madre Perinatales

Dentro de este grupo se engloban las SC presentes en los tejidos extraembrionarios formados durante el desarrollo del embrión, principalmente el fluido amniótico, la placenta y el cordón umbilical (Ilic and Polak, 2011). El fluido amniótico por ejemplo, contiene una población heterogénea de células multipotentes, entre las cuales se encuentran células con características similares a las MSC (Bai et al., 2012). Diversos estudios recientes han demostrado la capacidad de las SC derivadas del fluido amniótico para diferenciarse a tejidos procedentes de las tres capas embrionarias, y las ventajas de estas SC frente a las ESC como el hecho de que no requieren “feeder-layer” para su crecimiento, que no muestran ninguna diferenciación espontánea en cultivo, que su fenotipo no se ve afectado por su almacenamiento a largo plazo o que no son tumorigénicas (Joo et al., 2012; Klemmt et al., 2011). Respecto a la placenta, han sido identificadas células similares a las MSC y a progenitores hematopoyéticos en la sangre, el amnios o las vellosidades (Ilic and Polak, 2011) y también ha sido demostrada su capacidad para generar linajes celulares derivados de las tres capas germinales, así como su reducida expresión de HLA, su estabilidad cariotípica durante su mantenimiento o su bajo riesgo tumorigénico (Sabapathy et al., 2012). Por otra parte, las SC derivadas del cordón umbilical son las más estudiadas dentro de este grupo, existiendo actualmente bancos dedicados a la criopreservación de este tejido. Diferentes tipos celulares pueden ser aislados a partir de la sangre o del propio cordón umbilical como, por ejemplo, células con características similares a las MSC (Bieback et al., 2004; Sarugaser et al., 2005) o células con propiedades similares a las células progenitoras endoteliales (EPC) (Prasain et al., 2012). En la actualidad, estas células han sido ya utilizadas en pacientes para el tratamiento de diversas patologías (Ilic and Polak, 2011).

Células Madre Adultas

Las células madre adultas (ASC), también denominadas células madre somáticas, son células indiferenciadas con capacidad de auto-renovación y diferenciación a un determinado número de tipos celulares (Morrison and Kimble, 2006), que se localizan en los tejidos del individuo tras su nacimiento y durante la vida, donde participan en su natural homeostasis, mediando el continuo reemplazamiento

de células diferenciadas y manteniéndose quiescentes para responder a señales de lesión del tejido para regenerarlo (Li and Clevers, 2010).

La médula ósea fue el primer tejido adulto donde se identificaron ASC (Becker et al., 1963; Friedenstein et al., 1968), y actualmente es una de las principales fuentes de obtención. En la médula ósea se distinguen diferentes tipos de SC, siendo clasificadas en dos grandes grupos: i) las denominadas hematopoyéticas (HSC), que tienen la capacidad de generar todos los tipos celulares de la sangre, ii) y las no-hematopoyéticas, o células madre del estroma (BMSC), que dan lugar a los elementos estructurales del esqueleto, como hueso, cartílago y la grasa de la médula (Mezey, 2011). Dentro del grupo de las BMSC se han identificado diferentes poblaciones de SC como: MSC (Harichandan and Buhning, 2011; Prockop, 1997), células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) (Jiang et al., 2002), células inducibles de multilinaje adultas aisladas de médula ósea (MIAMI) (D'Ippolito et al., 2004), células madre muy pequeñas semejantes a las embrionarias (VSEL) (Kucia et al., 2006) o EPC (Asahara et al., 1999b). Algunos autores postulan que las MSC, MAPC y las células MIAMI podrían ser poblaciones solapadas de SC no-hematopoyéticas similares, que fueron identificadas por diversos investigadores utilizando diferentes estrategias experimentales y, por lo tanto, se les asignaron diferentes nombres (Ratajczak et al., 2008).

Las BMSC han sido ampliamente estudiadas para su posible aplicación en medicina regenerativa ya que diversas investigaciones evidencian que pueden ser movilizadas a la circulación y participar en la regeneración de tejidos periféricos tras producirse una lesión mediante cuatro posibles mecanismos: i) su diferenciación a células maduras o renovando las SC específicas del tejido, ii) la secreción de factores paracrinos que inducen la proliferación y/o diferenciación de las SC residentes en los tejidos, iii) la secreción de factores anti-apoptóticos que favorecen la supervivencia de las células dañadas, vi) y regulando la función del sistema inmune, alterando los patrones de producción de citoquinas (Mezey, 2011).

Otra fuente importante de ASC es el tejido adiposo, el cual se compone de una fracción vascular estromal (SVF) muy rica en SC multipotentes, generalmente denominadas como células madre derivadas del tejido adiposo (del inglés "human adipose-derived stem cells", hASC), con características similares a las MSC (Zuk et

al., 2002; Zuk et al., 2001). Aunque las MSC presentes en este tejido muestran algunas diferencias respecto a las obtenidas de la médula ósea, su potencial clínico es similar (Strioga et al., 2012). Además, las hASC muestran ciertas ventajas que las hacen más atractivas en el campo de la investigación biomédica puesto que: el tejido adiposo es muy abundante y se encuentra en todos los individuos; puede ser obtenido en grandes cantidades mediante un procedimiento quirúrgico simple que conlleva un mínimo riesgo y pocas molestias para el paciente; tiene un alto contenido en SC capaces de diferenciarse a múltiples linajes celulares de una manera controlable y reproducible; al poder aislarse del propio individuo permiten su trasplante autólogo y además, pueden ser cultivadas y manipuladas de acuerdo a las guías de buenas prácticas de fabricación (GMP) (Behr et al., 2010).

Aparte de estos tejidos, las ASC están presentes en prácticamente todos los tejidos postnatales del individuo, denominándose de modo general como SC residentes o tejido-específicas. Así, por ejemplo, han sido identificadas SC en el cerebro, la piel, el corazón, los músculos, los ojos, los riñones, los pulmones, el hígado, el tracto gastrointestinal, el páncreas, la mama, los ovarios, la próstata o los testículos (Behr et al., 2010; Mimeault et al., 2007). Estas SC tejido-residentes se localizan en determinadas regiones denominadas nichos, los cuales proporcionan un microambiente especial para la regulación y el mantenimiento de sus características de SC (Jones and Wagers, 2008; Moore and Lemischka, 2006). Su función en los tejidos es la de mantener su homeostasis natural y regenerar los daños que puedan producirse mediante el control de su auto-renovación y diferenciación (Mimeault and Batra, 2008), y se cree que la desregulación de este equilibrio podría ser la causa de la tumorigénesis (Rossi et al., 2008).

Células Madre Pluripotentes Inducidas

Las células iPS, como su nombre indica, son células pluripotentes con capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular derivado de las tres capas germinales embrionarias, y son obtenidas mediante la reprogramación de células diferenciadas (Ebben et al., 2011). Su similitud con las ESC ha sido demostrada mediante la obtención de ratones viables derivados de células iPS (Boland et al., 2009; Zhao et al., 2009).

Los primeros intentos para revertir el estado celular diferenciado a un estado embrionario estaban basados en la transferencia nuclear de células somáticas a ovocitos anucleados (Gurdon, 1962; Wilmut et al., 1997) y la fusión de células somáticas con ESC (Cowan et al., 2005). En el año 2006, Takahashi y Yamanaka identificaron cuatro factores transcripcionales, OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC, como los principales responsables del mantenimiento de las características pluripotenciales en las ESC, y mediante su introducción en fibroblastos de ratón consiguieron el establecimiento de la primera línea celular pluripotente a partir de células diferenciadas, siendo denominadas éstas como células iPS (Takahashi and Yamanaka, 2006). Un año después se consiguió la generación de células iPS humanas a partir de células somáticas maduras (Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007). En la actualidad se ha demostrado la posibilidad de obtener células iPS a partir de fibroblastos adultos humanos sin utilizar el factor transcripcional c-MYC (Nakagawa et al., 2008), e incluso se han generado células iPS humanas a partir de células de la sangre del cordón umbilical con los factores SOX2 y OCT4 (Giorgetti et al., 2009), y a partir de SC neuronales utilizando solamente OCT4 (Kim et al., 2009).

Estas células, a diferencia de las ESC, pueden ser derivadas directamente del paciente, lo que permite su uso como modelo de enfermedades y para determinar los fármacos más efectivos para cada paciente (Ebben et al., 2011). Sin embargo, el uso de las mismas en terapia regenerativa conlleva algunos problemas, ya que, aunque es posible obtenerlas del propio paciente a diferencia de las ESC, se ha visto que pueden ser rechazadas inmunológicamente (Zhao et al., 2011a). Además, su diferenciación es complicada y existe el riesgo de generación de teratomas (Brunt et al., 2012).

1.4. PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE

Tradicionalmente, las ESC se han considerado las únicas células pluripotentes naturales, es decir, con capacidad de diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias, a diferencia de las ASC que tienen un potencial de diferenciación más limitado pudiendo diferenciarse únicamente en distintos tipos celulares procedentes de la capa embrionaria de origen (Barrero and Izpisua Belmonte, 2011). Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de algunas ASC para generar tejidos originados a partir de las tres capas embrionarias, como es el caso de las SC derivadas de la médula ósea que tienen la

capacidad no sólo de originar linajes celulares mesodérmicos, sino también tipos celulares provenientes del ectodermo y endodermo (Jiang et al., 2002). No obstante, algunos autores consideran que esta capacidad es conferida por células pluripotentes residentes en este tejido, y señalan a las células VSEL como las posibles candidatas (Bhartiya, 2012), algo que aún no ha sido confirmado, ya que una de las características de las células pluripotentes es su capacidad para contribuir al desarrollo del blastocisto *in vivo*, y los estudios realizados hasta la fecha han sido infructuosos (Ratajczak et al., 2008).

La plasticidad de las SC hace referencia a la capacidad de células comprometidas a diferenciarse a un linaje celular determinado para generar células de otros órganos y tejidos diferentes, mediante un proceso denominado transdiferenciación (Phinney and Prockop, 2007; Strauss et al., 2012; Tosh and Slack, 2002). Este proceso requiere un cambio de compromiso en el compartimento de las SC unipotentes, o un proceso de desdiferenciación de las SC hacia un estado más indiferenciado, incluso al nivel de SC pluripotentes capaces de generar tejidos de las tres capas embrionarias, y su posterior diferenciación (Ratajczak et al., 2008). Los procesos de transdiferenciación y desdiferenciación parece ser que no son exclusivos de las SC. Así, se ha demostrado en varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que células diferenciadas maduras pueden transdiferenciarse en otros tipos celulares o desdiferenciarse, proliferar y posteriormente rediferenciarse en nuevos linajes celulares para la regeneración de un tejido u órgano tras un daño (Jopling et al., 2011). Uno de los procesos de transdiferenciación naturales más estudiados es el de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y su reverso, la transición mesenquimal-epitelial (MET), que tienen un rol muy importante en el desarrollo embriogénico, la regeneración de tejidos, la progresión del cáncer e incluso en el mantenimiento de las propiedades de las SC (Strauss et al., 2012; Thiery et al., 2009).

2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

2.1. CARACTERÍSTICAS

El término MSC engloba a un grupo heterogéneo de células multipotentes plástico-adherentes que comparten su capacidad de auto-renovación y de

diferenciación hacia células de linaje mesenquimal, incluyendo hueso, cartílago y tejido adiposo. Aparte del término extendido de célula madre mesenquimales, también se utilizan otros como células estromales de la médula, células estromales mesenquimáticas o células estromales mesenquimáticas multipotentes (Bieback and Brinkmann, 2010; da Silva Meirelles et al., 2008; Nauta and Fibbe, 2007; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997).

Aunque se cree que las MSC derivan del mesodermo, no existe consenso sobre el origen de este linaje celular durante el desarrollo embrionario. Algunos estudios indican que las MSC derivan del neuroepitelio a través de un intermediario de la cresta neural durante el desarrollo embrionario mediante un proceso de EMT (Takashima et al., 2007), habiéndose demostrado que células derivadas de la cresta neural migran a la médula ósea a través del torrente sanguíneo (Nagoshi et al., 2008). Así mismo, se ha observado que células residentes en la médula ósea que expresan la proteína de filamentos intermedios nestin, un marcador de células neuroepiteliales, tienen una capacidad funcional similar a las MSC (Mendez-Ferrer et al., 2010).

Por otro lado, el estudio de la amplia distribución tisular de las MSC en el individuo adulto indica que estas células residen *in vivo* en la población de pericitos vasculares que se hallan alrededor de las células endoteliales de los capilares y los microvasos (Figura 3) (da Silva Meirelles et al., 2008; Phinney, 2012; Zhang et al., 2012c). Diferentes estudios han demostrado la capacidad de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica de los pericitos (Farrington-Rock et al., 2004; Kirton et al., 2006) y además han evidenciado que las MSC muestran un transcriptoma y un fenotipo superficial similar al de los pericitos (Covas et al., 2008; Crisan et al., 2008), lo que hace sugerir que las MSC se originan a partir de éstos, apareciendo en condiciones fisiológicas normales como pericitos quiescentes, pudiendo responder a la lesión tisular y contribuir a la reparación y regeneración mediante su liberación a los vasos sanguíneos (Caplan, 2009; Crisan et al., 2008; da Silva Meirelles et al., 2008). Así mismo, también se postula que las MSC pueden estar relacionadas con las células de la túnica adventicia de las arterias y venas, ya que estas células expresan marcadores de MSC y algunos estudios demuestran que a partir de ellas pueden ser derivadas células similares a pericitos e incluso MSC. Estos hallazgos, apoyan la idea de que la región perivascular constituye el nicho natural de las MSC (Figura 3) (Corselli et al., 2010; Corselli et al., 2012).

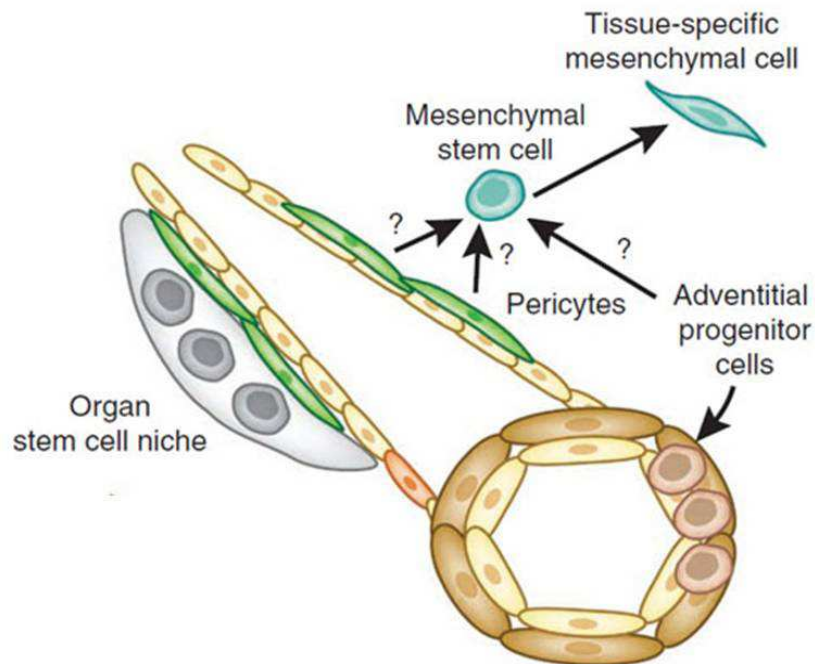


Figura 3. Nicho perivascular de las células madre mesenquimales (MSC)
(Imagen modificada de Bautch, 2011)

Para facilitar la caracterización de las MSC, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios mínimos para su identificación (Figura 4): i) deben ser plástico-adherentes al ser mantenidas en condiciones de cultivo estándar en frascos de cultivo tisular; ii) la población celular debe presentar unos niveles de expresión $\geq 95\%$ de los antígenos de superficie CD105 (SH2/endoglina), CD73 (SH3/SH4) y CD90 (THY1), medidos por citometría de flujo y, a su vez, deben carecer de la expresión de los marcadores CD45, CD34, CD14, o CD11b, CD79 α , o CD19 y HLA de clase II; iii) por último, las células deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* hacia diversos tipos celulares como osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo las correspondientes condiciones estándar de diferenciación (Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005).

Las MSC son utilizadas en medicina regenerativa principalmente en base a su capacidad de diferenciación hacia múltiples tipos celulares específicos y a su capacidad de producción de factores solubles que promueven la regeneración de los tejidos dañados mediante diversos mecanismos (De Miguel et al., 2012; Mezey, 2011). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que estas células pueden ser útiles

en la prevención o el tratamiento del rechazo de transplantes y como inmunosupresoras en enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Esto se debe a que se tratan de células inmunoprivilegiadas, ya que expresan bajos niveles de HLA y moléculas co-estimuladoras en su superficie celular, y que poseen propiedades inmunomoduladoras mediadas por interacciones célula-célula y por la secreción de factores solubles que interfieren en la respuesta inmune (Figura 4) (Bassi et al., 2011; De Miguel et al., 2012; Shi et al., 2010).

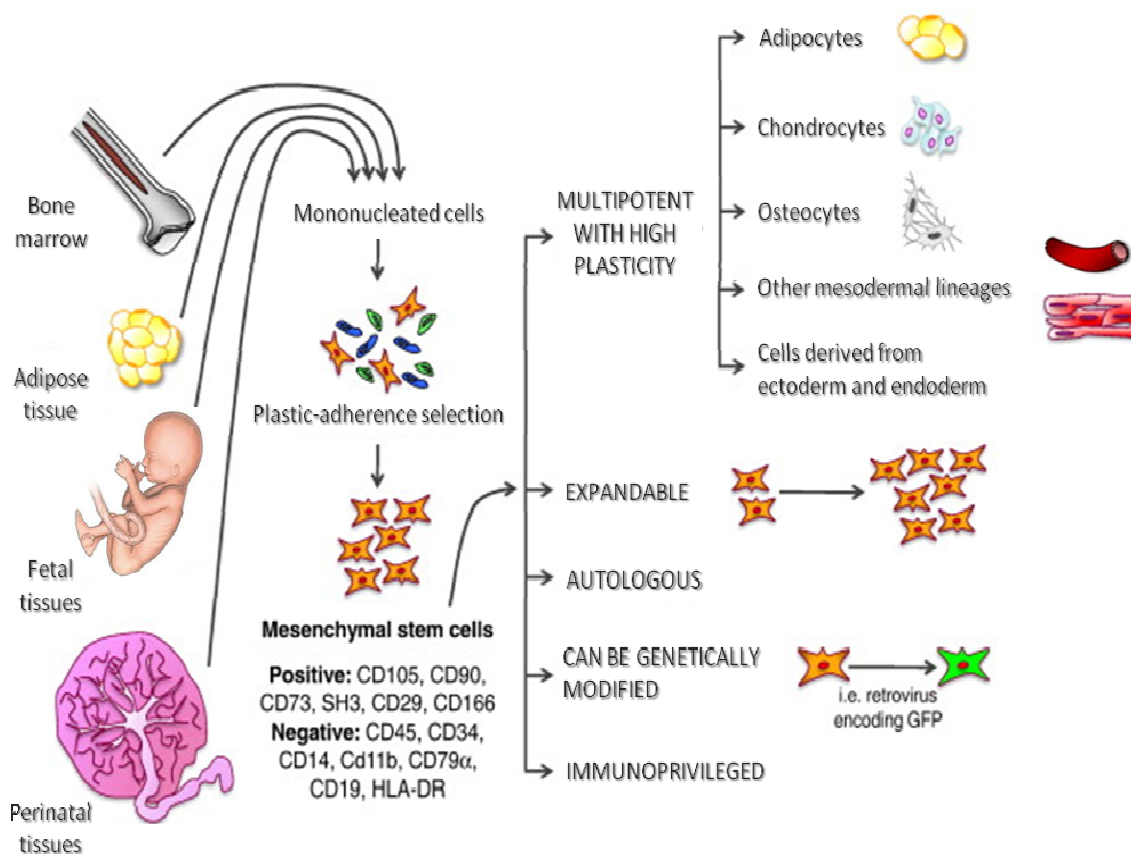


Figura 4. Principales características, fuentes de obtención y capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC) (Imagen modificada de Gnechi et al., 2012)

En este sentido, se ha demostrado que las MSC inhiben la diferenciación, maduración y activación de las células dendríticas, las cuales son iniciadoras de la respuesta inmune, inhibiendo la expresión de HLA-DR y de moléculas co-estimuladoras tales como CD40, CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2), requeridas para la activación de los linfocitos T. Además, provocan un incremento de la producción de citoquinas antiinflamatorias como la interleuquina-10 (IL-10) al tiempo que disminuyen la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como interferón- γ (IFN- γ), IL-12 y el factor

de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Nauta et al., 2006; Zhang et al., 2004). También se ha visto que las MSC producen diferentes factores solubles, entre los que se encuentran el TNF- β , el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), la óxido-nítrico sintasa inducible (iNOS), la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la prostaglandina E2 (PGE2) o el HLA-G5, implicados en la supresión de la función de linfocitos T, estimulando la expansión de linfocitos T reguladores a la vez que inhiben la proliferación de linfocitos T citotóxicos y colaboradores, provocando una disminución de la producción de IFN- γ (Bassi et al., 2011). Estos factores son a su vez responsables de suprimir la proliferación y diferenciación de linfocitos B, afectando a sus propiedades quimiotácticas y a la producción de inmunoglobulinas (Ig) (Corcione et al., 2006). Por otro lado, aunque las MSC autólogas y alogénicas pueden ser lisadas por las células “natural killer”, los factores que liberan inhiben la proliferación de estas células así como a su producción de IFN- γ (Spaggiari et al., 2006).

2.2. FUENTES DE OBTENCIÓN

Las MSC fueron por primera vez identificadas en la médula ósea por Friedenstein, quien las describió como una población de células estromales plástico-adherentes, de morfología similar a los fibroblastos, con capacidad de diferenciación ósea, refiriéndose a ellas como células precursoras osteogénicas (Friedenstein et al., 1976; Friedenstein et al., 1968). No obstante, un siglo antes el patólogo Julius Cohnheim ya propuso la existencia de SC no-hematopoyéticas en la médula ósea capaces de generar fibroblastos para regenerar heridas en tejidos periféricos (Cohnheim, 1867). Estudios posteriores demostraron la capacidad de las MSC para diferenciarse a otros linajes mesodérmicos, lo que llevó a Caplan a introducir el término de “células madre mesenquimales” para definir a esta población celular (Caplan, 1991).

Aunque las MSC fueron originalmente aisladas a partir de la médula ósea (Prockop, 1997), poblaciones similares han sido aisladas a partir de multitud de tejidos adultos como el tejido adiposo (Zuk et al., 2001), el músculo esquelético (Jackson et al., 2010), el páncreas (Kim et al., 2012), la dermis (Vaculik et al., 2012), el periostio (Mara et al., 2011), el cerebro (Paul et al., 2012), el timo (Sondergaard et al., 2010), el sinovio (Sekiya et al., 2012), los tendones (Salingcarnboriboon et al., 2003), los ligamentos cruzados (Cheng et al., 2009), las trompas de Falopio (Jazedje et al.,

2009), el endometrio (Schwab and Gargett, 2007), los pulmones (Griffiths et al., 2005), el corazón (Beltrami et al., 2003), etc., y se postula que en prácticamente todos los órganos y tejidos postnatales aparecen MSC en un nicho perivascular (Crisan et al., 2008; da Silva Meirelles et al., 2006; Hass et al., 2011).

Por otro lado, poblaciones de MSC han sido también aisladas a partir de tejidos perinatales y prenatales (Figura 4) (Zhang et al., 2012c). Así, por ejemplo, han sido identificadas MSC en la placenta (In 't Anker et al., 2004), el fluido amniótico (In 't Anker et al., 2003b), el cordón umbilical (Majore et al., 2011), el amnios, el corion (Bacenkova et al., 2011) o la sangre de cordón umbilical. Esta última presenta un bajo contenido en MSC, por lo que el volumen y el tiempo de almacenamiento de la sangre de cordón umbilical son parámetros determinantes para el correcto aislamiento de las mismas (Bieback et al., 2004). Otras fuentes de obtención de MSC han sido identificadas en diversos tejidos fetales como la médula ósea, la sangre, el hígado (Campagnoli et al., 2001), los pulmones, el bazo (in 't Anker et al., 2003a), los metanefros (Almeida-Porada et al., 2002), la dermis (Zhao et al., 2005), el páncreas (Hu et al., 2003) o el timo (Rzhaninova et al., 2005), entre otros.

Como se ha descrito, son muchas y variadas las posibles fuentes de obtención de MSC (Figura 4). Diversos estudios han evidenciado diferencias en las poblaciones celulares obtenidas en función de su origen. Así, por ejemplo, se ha demostrado que las MSC obtenidas de tejidos perinatales tienen una mayor capacidad proliferativa que las obtenidas de tejidos adultos, siendo este potencial aún mayor en las MSC de origen fetal (Hass et al., 2011; Zhang et al., 2012c). Además, las MSC obtenidas de tejidos perinatales y prenatales muestran mayor expresión de ciertos marcadores de pluripotencia embrionarios que las de origen adulto, sin mostrar riesgo de tumorigenicidad. También se ha observado que las MSC fetales muestran una menor expresión de HLA de clase I en comparación con las de otros orígenes (Bieback and Brinkmann, 2010; Zhang et al., 2009). Por otro lado, diversos estudios demuestran que la edad del individuo puede reducir el contenido de MSC en diferentes tejidos adultos, así como su capacidad proliferativa y de diferenciación (Alt et al., 2012; Mareschi et al., 2006). Sin embargo, aunque las MSC aisladas a partir de tejidos perinatales y prenatales muestran ciertas ventajas biológicas respecto a las de tejidos adultos, su posible utilización en trasplantes autólogos para regeneración tisular conlleva ciertos inconvenientes. Así pues, la obtención de MSC autólogas a partir de estos tejidos

puede suponer riesgos para la madre o el feto, además, su empleo para estos fines puede requerir su almacenaje por largos periodos de tiempo. Esto hace que los tejidos adultos constituyan la mejor fuente de obtención de MSC autólogas para su uso en medicina regenerativa.

De todas las posibles fuentes de obtención de MSC en el adulto, la que ha suscitado más interés desde su descubrimiento a principios de este siglo ha sido el tejido adiposo (Halvorsen et al., 2001; Zuk et al., 2001). Las células multipotentes plástico-adherentes contenidas en este tejido han recibido diferentes nomenclaturas tales como células de lipoaspirados procesados, células estromales derivadas del tejido adiposo, MSC derivadas adiposas o SC multipotentes humanas derivadas adiposas, por lo que en el año 2004 la Sociedad Internacional de la Tecnología Aplicada a la Grasa llegó al consenso de utilizar el término “human adipose-derived stem cells” (hASC) para definir a esta población celular (Mitchell et al., 2006).

Las hASC son fácilmente aislables en grandes cantidades a partir de muestras de lipoaspirados obtenidas por un procedimiento quirúrgico simple denominado liposucción, que no conlleva apenas molestias ni riesgos para el paciente, siendo susceptibles de ser empleadas autólogamente (Zuk et al., 2001). A partir de la disgregación enzimática de este tejido es posible obtener la SVF que contiene diferentes tipos celulares entre los que se incluyen hASC, fibroblastos, células endoteliales, pericitos, células musculares lisas y otros tipos de células circulantes como células del sistema inmune y HSC. Las hASC son aisladas en base a su capacidad de adhesión a la superficie plástica de cultivo, mostrando una morfología fibroblástica al crecer en condiciones *in vitro* (Al Battah et al., 2011).

Estas células cumplen los requisitos mínimos establecidos por la ISCT para ser consideradas MSC, aunque muestran algunas diferencias en su inmunofenotipo, su capacidad de proliferación, su potencial de diferenciación, su transcriptoma, su proteoma y su actividad inmunomoduladora respecto a las obtenidas de médula ósea, siendo en parte debidas a diferencias en los protocolos de aislamiento y cultivo utilizados (Al-Nbaheen et al., 2012; Strioga et al., 2012). Desde el punto de vista de su posible aplicación clínica, diversos estudios muestran ciertas ventajas de la utilización del tejido adiposo como fuente de MSC respecto a la médula ósea, entre las que se encuentran: la abundancia de este tejido en los individuos, su facilidad de obtención

mediante procedimientos mínimamente invasivos, el mayor contenido en MSC de este tejido o la mayor capacidad proliferativa de las células obtenidas (Behr et al., 2010; Strioga et al., 2012; Zhu et al., 2008b).

2.3. DIFERENCIACIÓN

2.3.1. PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Una de las características definitorias de las MSC es su capacidad de diferenciación *in vitro* a diferentes linajes celulares de origen mesodérmico tales como osteoblastos, condroblastos y adipocitos (Figura 4), existiendo en la actualidad kits comerciales disponibles para la realización de estos ensayos de diferenciación *in vitro* (Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005). Así mismo, las MSC son capaces de diferenciarse a otros tipos celulares de origen mesodérmico tales como células musculares, cardiomiocitos o células endoteliales (Figura 4) (Quevedo et al., 2009).

Respecto a la diferenciación osteogénica, ésta puede ser inducida mediante la suplementación del medio de cultivo con FBS, β -glicerol-fosfato, ácido ascórbico-2-fosfato y dexametasona, que provocan un aumento de la actividad alcalina fosfatasa y la deposición de una matriz extracelular (ECM) mineralizada rica en calcio (Barry and Murphy, 2004), aunque también pueden utilizarse otras sustancias como la 1,25-dihidroxitamina D3 (Titorencu et al., 2007) o las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) (Dragoo et al., 2003), siendo generalmente confirmada dicha diferenciación mediante la tinción de Von Kossa o con Rojo de Alizarina (Hass et al., 2011). Por otra parte, el cultivo en 3-dimensiones de las MSC en medio de cultivo libre de suero y suplementado con miembros de la superfamilia TGF- β induce la expresión de componentes de la ECM específicos del tejido cartilaginoso (Barry and Murphy, 2004), siendo favorecida la diferenciación condrogénica por la adición de ascorbato-2-fosfato y dexametasona (Ma et al., 2003), aunque se ha demostrado también que proteínas como el factor de crecimiento y diferenciación-5 (GDF-5) (Feng et al., 2008), o el FGF-2 (Chiou et al., 2006) promueven la formación de colágeno II y glicosaminoglicanos (GAG), que suelen ser detectados por tinciones inmunohistoquímicas (Hass et al., 2011). Para inducir la diferenciación adipogénica pueden ser empleadas moléculas como el receptor de peroxisoma-proliferador-activado- γ (PPAR- γ), la ácido graso sintasa (FAS) (Barry and Murphy, 2004), las tiazolidinedionas activadoras de PPAR

(Spiegelman, 1998), o incluso el FGF-2 (Kakudo et al., 2007) o el 17 β -estradiol (Hong et al., 2007), entre otras, siendo utilizada generalmente una tinción con Rojo Aceite para determinar la diferenciación adipocítica (Hass et al., 2011).

Por otro lado, existen evidencias de que las MSC pueden diferenciarse también a linajes celulares derivados del ectodermo y el endodermo, es decir, pueden experimentar un fenómeno de transdiferenciación (Figura 4) (Al Battah et al., 2011; Chanda et al., 2010; Mizuno et al., 2012; Phinney and Prockop, 2007; Wong, 2011). En este sentido, se han conseguido obtener, a partir de MSC, células hepáticas (Banas et al., 2009), células pancreáticas (Yuan et al., 2012) o células epiteliales respiratorias (Ricciardi et al., 2012), que son de origen endodérmico. También ha sido demostrada la capacidad de transdiferenciación de las MSC a células epidérmicas (Jin et al., 2011) y neuronas (Bae et al., 2011), que son derivadas del ectodermo.

2.3.2. DIFERENCIACIÓN CARDIACA

En relación a la capacidad de las MSC para diferenciarse a células cardíacas, diversas investigaciones han demostrado este potencial tanto *in vitro* como *in vivo*. La obtención de células de linaje cardíaco a partir de MSC puede llevarse a cabo *in vitro* mediante diversos procedimientos tales como el co-cultivo con cardiomiocitos (Arminan et al., 2010; Rangappa et al., 2003a), el empleo de extractos celulares obtenidos a partir de cardiomiocitos diferenciados (Gaustad et al., 2004; Peran et al., 2010), o el tratamiento con diversos factores (Mohanty et al., 2011).

La adquisición de un fenotipo cardíaco suele ser determinada por la aparición de células binucleadas; la expresión de determinados marcadores específicos de linaje cardíaco como la Desmina, que es considerado un marcador temprano de diferenciación miogénica, la α -Actinina sarcomérica, la cadena pesada de la β -miosina (β -MHC), las Troponinas I y T cardíacas, o la Lamina A/C, que es expresada nuclearmente en células terminalmente diferenciadas (Gaustad et al., 2004; Haghani et al., 2012); o la expresión de ciertos factores de transcripción tales como GATA4 y NKX2.5, que son translocados al núcleo para promover la diferenciación cardiomiocítica (Arminan et al., 2010; Balana et al., 2006).

Uno de los procedimientos más empleado, del cual existen un gran número de estudios en la bibliografía, se basa en la utilización de la 5-azacitidina (5-aza) para inducir la diferenciación cardiaca de las MSC *in vitro* (Antonitsis et al., 2008; Haghani et al., 2012; Meligy et al., 2012; Rangappa et al., 2003b). La 5-aza es un agente desmetilante que inhibe la acción de la DNA metiltransferasa, evitando la metilación del DNA tras la división celular y, por lo tanto, reactiva la transcripción de genes anteriormente silenciados (Balana et al., 2006). Recientes estudios evidencian que uno de los mecanismos involucrados en el proceso de diferenciación cardiaca de las MSC por la exposición a 5-aza es mediado por la activación de ERK (Qian et al., 2012). Otros factores que han sido empleados en diversos ensayos de diferenciación cardiaca de MSC humanas son, entre otros, el TGF- β 1 (Mohanty et al., 2011), agentes donadores de óxido nítrico (NO) (Rebelatto et al., 2009), o la combinación de varios factores como insulina, dexametasona y ácido ascórbico (Shim et al., 2004).

Por otra parte, se sabe que las MSC son capaces de migrar hacia el tejido cardiaco dañado movilizadas por la liberación de determinadas moléculas como el factor 1 derivado del estroma (SDF-1/CXCL12), el HGF o la quimiocina CC ligando 2 (CCL2), entre otras (Abbott et al., 2004; Belema-Bedada et al., 2008; Vogel et al., 2010). Diferentes ensayos *in vivo* han demostrado la diferenciación cardiomiocítica de MSC administradas tras un infarto de miocardio agudo (AMI) tanto en modelos animales como en humanos, habiéndose observado una reducción de la zona infartada y una mejora de la función cardiovascular, incrementando la capacidad contráctil y el flujo sanguíneo (Quevedo et al., 2009; Viswanathan et al., 2010). Sin embargo, la regeneración tisular mediada por las MSC parece ser que no es sólo debida a la diferenciación de éstas en células cardiacas, sino también a la mejora de la vascularización y a la producción de factores paracrinicos que favorecen la regeneración del tejido dañado mediante otros mecanismos (Gnecchi et al., 2012).

2.3.3. DIFERENCIACIÓN VASCULAR

Respecto a la diferenciación de las MSC a células vasculares, se sabe que la vasculogénesis durante el desarrollo embrionario es producida por células de origen mesodérmico denominadas angioblastos (Bautch, 2011). Estas células progenitoras se localizan en la zona adyacente al endodermo y producen una ECM que contiene moléculas con capacidad de unión a factores de crecimiento pro-vasculares, como el

factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) producido por las células endodérmicas, que inducen la formación del plexo vascular primario a partir de los angioblastos (Kohn-Luque et al., 2011). Por otra parte, diferentes estudios demuestran que las MSC están implicadas en la vascularización postnatal, especialmente durante la isquemia de los tejidos y la vascularización de los tumores (Ball et al., 2007), habiéndose demostrado *in vivo* su capacidad de diferenciación tanto a células endoteliales como a células musculares lisas vasculares (Quevedo et al., 2009). Recientemente se ha identificado el mecanismo de señalización por el cual el VEGF regula la movilización, el reclutamiento a los sitios de neovascularización y la diferenciación de las MSC a células vasculares, siendo esto debido a que, aunque las MSC no expresan receptores de VEGF (VEGFR), si presentan gran cantidad de receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) que son estimulados por el VEGF (Ball et al., 2007).

La diferenciación de las MSC a células de la vasculatura, se ha demostrado *in vitro* mediante diferentes estrategias. Así, por ejemplo, en ensayos de angiogénesis, el cultivo de las MSC en un medio suplementado con determinados factores, principalmente VEGF, induce la diferenciación endotelial de las MSC, adquiriendo la capacidad de formar estructuras de tipo capilar y expresando marcadores específicos de linaje endotelial. Algunos de estos marcadores son el VEGFR1, también conocido como tirosina quinasa 1 de tipo FMS (FLT-1); VEGFR2, que recibe otros nombres como CD309, receptor con dominio inserto-quinasa (KDR) o quinasa de hígado fetal 1 (FLK-1); la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina), también llamada CD144; el factor de von Willebrand (vWF); o el receptor tirosina quinasa con dominios de homología de Ig y del factor de crecimiento epidérmico (EGF) endotelial (TIE-2), también denominado CD202b o tirosina quinasa endotelial (TEK) (Colazzo et al., 2010; Gang et al., 2006; Oswald et al., 2004).

Otra metodología empleada en la diferenciación endotelial consiste en el co-cultivo de MSC con células endoteliales maduras (EC), habiéndose observado en los primeros estadios de diferenciación no sólo la expresión de marcadores de células endoteliales, sino también de células musculares lisas (Lozito et al., 2009). Además, resultados obtenidos en recientes estudios determinan que la exposición de las MSC a condiciones de hipoxia incrementa la capacidad angiogénica de estas células (Stubbs et al., 2012).

3. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES

3.1. CARACTERÍSTICAS

Las EPC constituyen una pequeña población de células de linaje endotelial que circulan en la sangre periférica, por lo que también han sido denominadas como EPC circulantes (CEPC) o células endoteliales circulantes (CEC). Estas células son poco diferenciadas, tienen capacidad de auto-renovación y participan activamente en la vasculogénesis, angiogénesis y arteriogénesis que se produce durante la neovascularización postnatal, tanto en procesos fisiológicos como patológicos (Asahara et al., 2011; Prasain et al., 2012).

Las EPC fueron identificadas por primera vez por Asahara y cols. en el año 1997, denominándolas como EPC o angioblastos, y postulando su posible origen común con las HSC (Asahara et al., 1997). En su estudio, Asahara determinó que estas células tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* a un fenotipo endotelial, así como su participación *in vivo* en procesos angiogénicos, abriendo una nueva vía de investigación en el campo de la regeneración vascular. Respecto al origen de las EPC y su relación con las HSC existen diferentes teorías: i) el *modelo del hemangioblasto*, que propone la existencia de un progenitor común endotelial y hematopoyético, denominado hemangioblasto, que se originaría a partir de la capa germinal mesodérmica (Figura 5A); ii) el *modelo del endotelio hemogénico*, que postula que el propio endotelio puede sufrir divisiones asimétricas y originar tanto HSC como EPC, que serían liberadas a la sangre periférica (Figura 5B); iii) o el *modelo híbrido*, que defiende la existencia de un hemangioblasto que originaría tanto HSC como un endotelio hemogénico, el cual, a su vez, serviría de fuente para la generación tanto de HSC como de EPC (Figura 5C) (Asahara et al., 2011; Bautch, 2011; Yoder, 2010).

La caracterización de las EPC es aún motivo de controversia y, en la actualidad, no existe un consenso entre la comunidad científica con respecto al fenotipo característico de esta población celular. Las EPC fueron aisladas por primera vez a partir de sangre periférica humana en base a su capacidad de expresar los marcadores de superficie CD34, también conocido como mucosialina, y KDR; y cultivadas en superficies de cultivo recubiertas con fibronectina para favorecer su

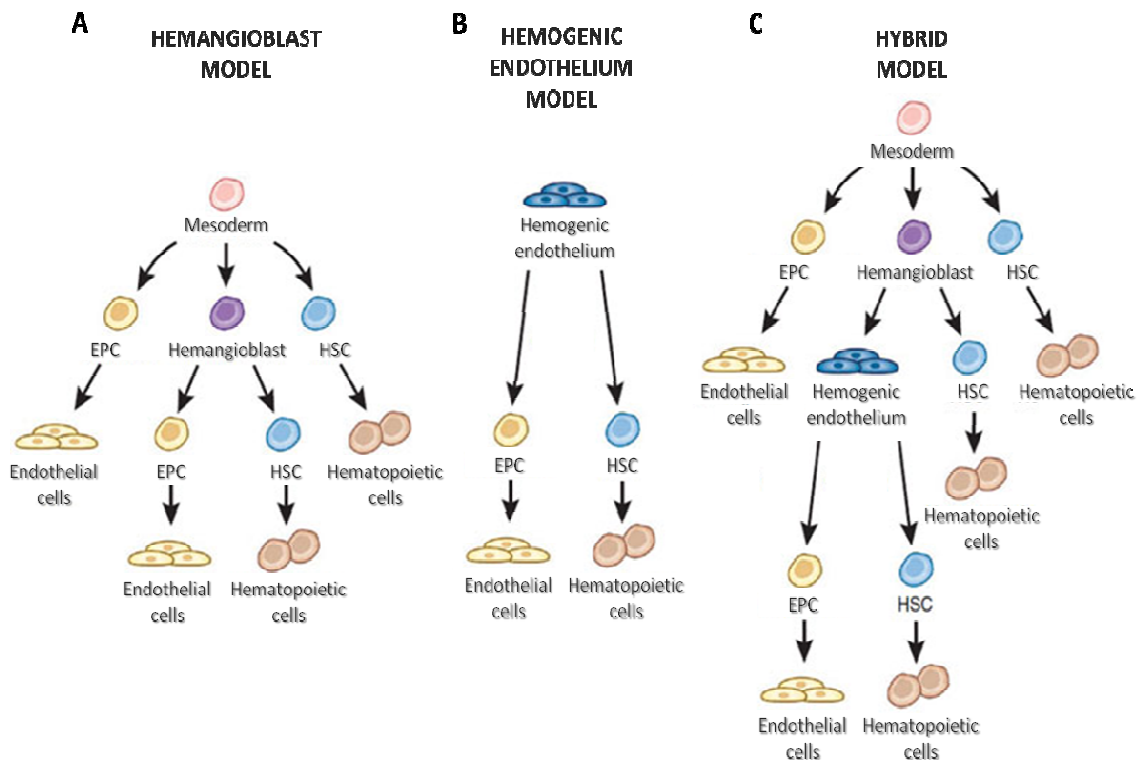


Figura 5. Posibles modelos de derivación de células madre hematopoyéticas (HSC) y células progenitoras endoteliales (EPC) (Imagen modificada de Bautch, 2011)

adhesión (Asahara et al., 1997). En estudios posteriores, han sido utilizados una gran variedad de marcadores para identificar a las EPC, entre los que se encuentran: CD34, KDR, CD133 (PROM1), CD45, CD31 (PECAM-1), VE-cadherina, CD146, CD184 (CXCR4), CD105 (endoglina), CD14, TIE-2, FGFR1, CD11b o CD62L (Asahara et al., 2011; Kim and von Recum, 2008; Timmermans et al., 2009; Yoder, 2010).

Uno de los aspectos más importantes a considerar a la hora de identificar a las EPC consiste en poder distinguirlas de las EC, ya que ambas presentan un fenotipo semejante, y de las HSC, con las que muestran ciertas similitudes debido a su origen común (Tabla 1). En este sentido, las EPC pueden ser caracterizadas como una población de células que, al igual que las HSC, expresan los marcadores de superficie CD34, CD133, CXCR4, KDR, TIE-2, FLT1 y CD105, entre otros (Asahara et al., 2011; Kim and von Recum, 2008; Wang, 2006), pero que, a diferencia de éstas, muestran una baja expresión o una pérdida completa del antígeno hematopoyético CD45 (La Vignera et al., 2011; Numaguchi et al., 2006), y expresan marcadores específicos de células endoteliales como la VE-cadherina y CD146 (Tabla 1) (La Vignera et al., 2011;

Paprocka et al., 2011; Timmermans et al., 2009). En relación a KDR, aunque se ha visto que también está presente en HSC, su expresión va disminuyendo durante la maduración de las células precursoras hematopoyéticas CD45⁺ (Hirai et al., 2005). Además de estos marcadores, también suele determinarse el linaje endotelial por la capacidad de unión a ciertas lectinas de origen vegetal como la aglutinina-1 de *Ulex europaeus* (UEA-1), la captación de lipoproteínas de baja densidad acetiladas (Ac-LDL) o la expresión intracelular del vWF (Kim and von Recum, 2008; Neumuller et al., 2006).

Tabla 1. Comparación entre las características de células madre hematopoyéticas (HSC), células progenitoras endoteliales (EPC) y células endoteliales maduras (EC)

TIPO CELULAR	CARACTERIZACIÓN
HSC	CD45 ⁺ , CD34 ⁺ , CD133 ⁺ , CXCR4 ⁺ , TIE-2 ⁺ , KDR ⁺ , FLT1 ⁺ , CD105 ⁺ , VE-cadherina ⁻ , CD146 ⁻ , CD31 ⁻ , vWF ⁻
EPC	CD45 ^{-/+débil} , CD34 ⁺ , CD133 ⁺ , CXCR4 ⁺ , TIE-2 ⁺ , KDR ⁺ , FLT1 ⁺ , CD105 ⁺ , VE-cadherina ^{+débil} , CD146 ⁺ , CD31 ^{+débil} , vWF ^{+débil} , Captación de Ac-LDL, Unión a UEA-1
EC	CD45 ⁻ , CD34 ^{-/+débil} , CD133 ⁻ , CXCR4 ⁺ , TIE-2 ⁺ , KDR ⁺ , FLT1 ⁺ , CD105 ⁺ , VE-cadherina ⁺ , CD146 ⁺ , CD31 ⁺ , vWF ⁺ , Captación de Ac-LDL, Unión a UEA-1, eNOS ⁺ , Capillary like structures <i>in vitro</i>

Por otra parte, el estudio de la maduración de las EPC hacia un linaje diferenciado muestra que, durante este proceso, se produce un aumento de la expresión de los antígenos CD31 y VE-cadherina, así como del vWF, a la vez que se produce una pérdida progresiva de la expresión de los antígenos CD133 y CD34 (Tabla 1) (Papayannopoulou, 2004; Schatteman et al., 2007). También se ha determinado que, durante la maduración de las EPC, genes como *TIE-2* o *CCR7* dejan de expresarse, mientras que se mantiene la expresión de genes como *DLL4* y *CXCR4*, y aumenta la de genes como *CDK2* (Igreja et al., 2008). Esto permite distinguir diferentes poblaciones de EPC en función de su estado de diferenciación, que son denominadas como EPC tempranas y EPC tardías (Yoon et al., 2005). Por otro lado, se considera que las EC expresan la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y

que la formación de estructuras de tipo capilar en ensayos *in vitro* se debe a la diferenciación de EPC a EC (Kim and von Recum, 2008).

Tras la identificación de EPC en la sangre periférica, se determinó que éstas procedían de la médula ósea y eran movilizadas a la sangre para incorporarse a zonas de neovascularización en procesos fisiológicos y patológicos (Asahara et al., 1999a; Shi et al., 1998). Aunque estas células han sido principalmente identificadas en la médula ósea, la sangre periférica y de cordón umbilical (Ahrens et al., 2011), recientes estudios evidencian que pueden ser obtenidas también a partir de órganos como el hígado y el intestino (Aicher et al., 2007), el tejido adiposo (Xue et al., 2010) o las paredes de los vasos sanguíneos (Ingram et al., 2005). Actualmente se postula que las EPC pueden ser divididas en dos categorías principales en base a su origen: i) *EPC hematopoyéticas*, que derivan de la médula ósea y que, a su vez, pueden estimular a diversos componentes celulares de la sangre originando una población celular heterogénea compuesta por EPC formadoras de colonias, EPC no formadoras de colonias, EPC mieloides y células angiogénicas; ii) y *EPC no-hematopoyéticas*, que no están relacionadas con las HSC y derivan de SC de diferentes tejidos o a partir de los vasos sanguíneos de los órganos (Asahara et al., 2011).

En relación a este último grupo, se ha observado que el fenotipo de las EPC originadas a partir de linajes no hematopoyéticos difiere parcialmente del anteriormente expuesto. Así, por ejemplo, se ha demostrado que un tipo de EPC no hematopoyéticas, denominadas como células derivadas endoteliales (del inglés “endothelial outgrowth cells”, EOC), no se originan a partir de precursores hematopoyéticos CD45⁺ ni CD133⁺, sino a partir de una fracción celular CD34⁺/CD45⁻/CD133⁻ (Timmermans et al., 2007). También se ha visto que las EPC movilizadas a la sangre desde órganos como el hígado o el intestino derivan de células precursoras residentes en estos tejidos con fenotipo c-KIT⁺/CD45⁻ (Aicher et al., 2007). Todos estos estudios revelan la dificultad que existe para establecer un fenotipo estándar para la caracterización de las EPC, ya que éste puede verse afectado tanto por el origen como por el estado de maduración de las mismas.

Una de las principales características de las EPC es su capacidad de diferenciación a EC. En este sentido, se sabe que el VEGF, además de mediar la movilización y expansión de las EPC, es el principal inductor de su diferenciación

endotelial (Dimmeler et al., 2001; Shi et al., 1998; Tang et al., 2011). Esta diferenciación es favorecida *in vitro* mediante la utilización de estructuras denominadas “scaffolds”, o superficies de cultivo revestidas por una ECM de fibronectina, colágeno, fibrina o del fragmento E de la fibrina (Caiado et al., 2011; Wijelath et al., 2004). También hay estudios que demuestran que la aplicación *in vitro* de una tensión de cizallamiento, que se define como la fuerza por unidad de área que el flujo sanguíneo ejerce en la pared vascular, provoca la diferenciación endotelial de las EPC (Egorova et al., 2012; Yamamoto et al., 2003). Se ha observado que la aplicación de esta fuerza a los cultivos suprime la expresión de genes que codifican para CD34 y CD133, a la vez que aumenta la expresión de mRNA de los genes que codifican para CD31 y vWF, siendo esto indicativo de la diferenciación endotelial de las EPC (Suzuki et al., 2012).

Además de la capacidad de las EPC para diferenciarse a EC, algunos estudios indican que estas células tienen la capacidad de transdiferenciarse a células musculares lisas mediante un proceso de transición endotelial-mesenquimal (EndMT) al ser tratadas con TGF- β 1 (Diez et al., 2010; Imamura et al., 2010). Por otro lado, también hay evidencias de que las EPC pueden expresar marcadores cardíacos *in vitro* al ser co-cultivadas con cardiomiocitos (Koyanagi et al., 2005; Murasawa et al., 2005) y, además, se ha demostrado en modelos experimentales *in vivo* que las EPC pueden transdiferenciarse a cardiomiocitos y participar en la regeneración del tejido cardíaco tras producirse una lesión (Iwasaki et al., 2006; Li et al., 2010). Respecto a la relación de las EPC con las cardiomiopatías y las enfermedades vasculares, diferentes estudios demuestran que el número de EPC circulantes está inversamente correlacionado con el riesgo cardiovascular y puede ser utilizado como marcador pronóstico de posibles eventos cardiovasculares (Bakogiannis et al., 2012; Fadini et al., 2012).

3.2. NEOVASCULARIZACIÓN POSTNATAL

Dentro de la neovascularización postnatal se engloban tres diferentes mecanismos que ocurren durante procesos tanto fisiológicos como patológicos: i) la angiogénesis, que consiste en la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes; ii) la arteriogénesis, por el cual los canales de células endoteliales son recubiertos por pericitos y células musculares lisas; iii) y la vasculogénesis, que

supone la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células precursoras endoteliales circulantes (Asahara et al., 2011; Gneccchi et al., 2012).

3.2.1. HOMEOSTASIS VASCULAR

El mantenimiento de las propiedades del sistema vascular está mediado por diferentes factores pro-angiogénicos, especialmente el VEGF, una citoquina que actúa principalmente mediante la unión a dos receptores tirosina quinasa de alta afinidad que son expresados por las células de linaje endotelial, el VEGFR1 (FLT-1) y el VEGFR2 (KDR/FLK-1) (Mustonen and Alitalo, 1995). Según estudios recientes, en condiciones no patológicas el mantenimiento de la integridad del endotelio es principalmente mediado autónomamente gracias a la producción de VEGF por las propias EC, el cual es capaz de activar endógenamente a los receptores KDR y desencadenar una señalización autocrina (Lee et al., 2007). Además, las células endoteliales en ausencia de señales angiogénicas se mantienen en un estado quiescente gracias a otros factores como la angiopoyetina-1 (ANG-1) y diferentes miembros de la familia de los FGF, que son producidos por las propias células endoteliales y los pericitos que recubren el vaso, y a la regulación de la ruta de señalización Notch (Carmeliet and Jain, 2011).

Cuando ocurre un accidente vascular, se produce una disminución del flujo de oxígeno en el tejido que es detectada por las células endoteliales gracias a unas proteínas de dominio proliil hidroxilasa (PHD) que hidroxilan diferentes factores inducibles por hipoxia (HIF) (Sen Banerjee et al., 2012). Ante una situación de hipoxia, estas células producen HIF-1 α el cual, a su vez, induce la producción de factores como el VEGF y la citoquina SDF-1 (Figura 6) (Fraisl et al., 2009). La movilización de las EPC a los sitios de isquemia está principalmente mediada por la unión de SDF-1 a su receptor CXCR4, lo que provoca la activación de ERK, y de la ruta de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/AKT y un aumento de la expresión de eNOS, que son responsables de la migración de estas células (Oh et al., 2010). Por otro lado, el VEGF también participa en la movilización de las EPC a los tejidos isquémicos, aunque su principal función consiste en inducir la proliferación y diferenciación de las EPC a EC en los sitios de neovascularización (Ceradini et al., 2008). La movilización de las EPC desde la médula ósea está mediada por la activación de metaloproteasas de la matriz (MMP), como la MMP9, que degradan la ECM permitiendo la liberación de las EPC de

este tejido y su migración al flujo sanguíneo (Figura 6) (George et al., 2011). Aparte del VEGF y el SDF-1, otros factores como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) también median la migración de las EPC a los lugares de formación de nuevos vasos en diversos procesos (Kawamoto and Losordo, 2008).

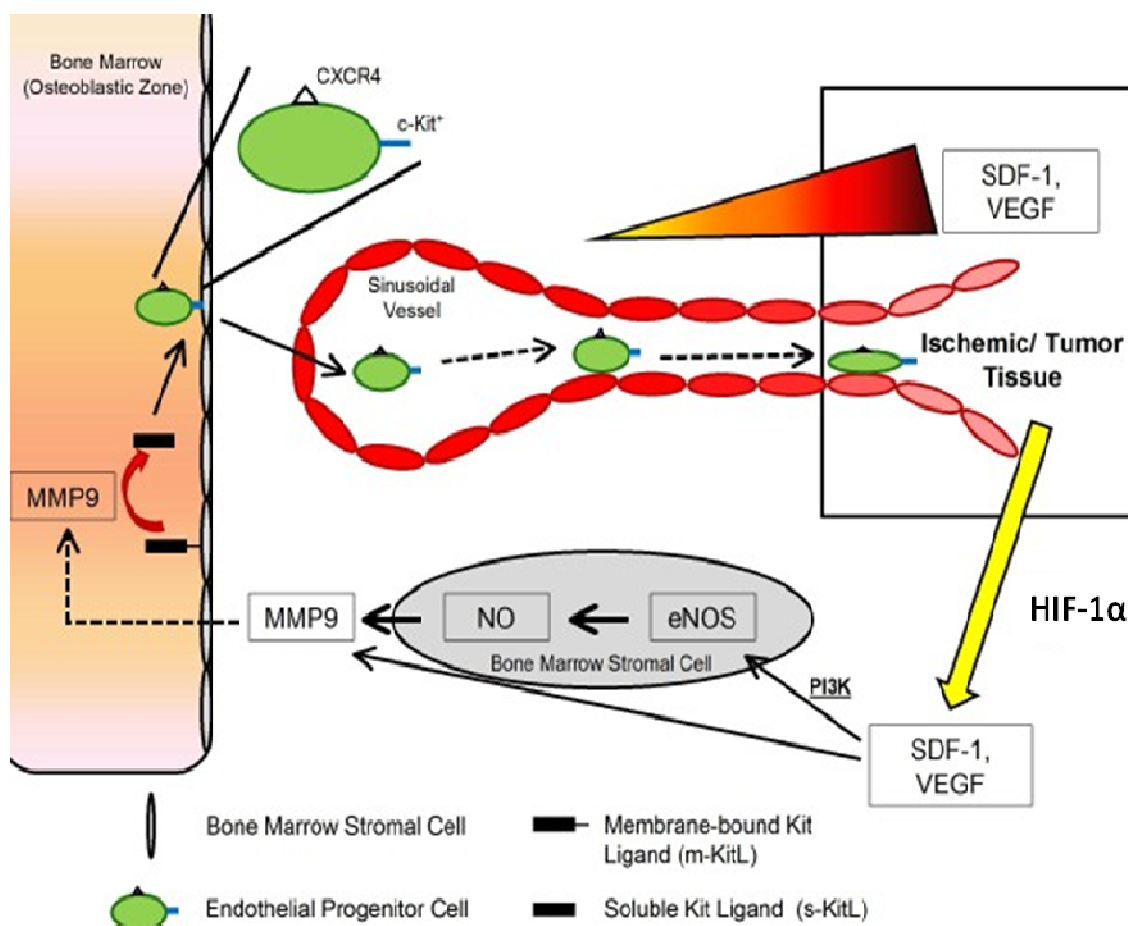


Figura 6. Movilización de células progenitoras endoteliales (EPC) a las zonas de isquemia y tumorales (Imagen modificada de George et al., 2011)

Además de la participación directa de las EPC en la neovascularización mediante su integración en los lugares de formación de nueva vasculatura en los órganos isquémicos, las EPC que migran a estos tejidos no siempre participan en la formación de los vasos, sino que también pueden quedar residentes en el tejido intersticial, liberando una variedad de citoquinas pro-angiogénicas y factores de crecimiento como por ejemplo VEGF, ANG-1, HGF o SDF-1, que actúan de forma paracrina para favorecer la angiogénesis local, promoviendo la proliferación y

movilización de las células endoteliales de los tejidos en los que residen para restablecer su homeostasis (Asahara et al., 2011; Miyamoto et al., 2007; Urbich et al., 2005).

Dentro de los factores que median la angiogénesis vascular, además de los miembros de la familia VEGF, principalmente el VEGF-A que estimula la angiogénesis a través de los receptores KDR, son importantes otros factores como: i) las neuropilinas, que son co-receptores del VEGF; ii) la ANG-2, cuyo receptor principal es el TIE-2; iii) determinados miembros de la familia de los FGF; iv) citoquinas como el SDF-1; v) las integrinas; vi) o el DLL4, el cual es un ligando de los receptores NOTCH. Además, otros factores producidos por las células endoteliales como el PDGF-B, la ANG-1 o la efrina-B2, entre otros, son responsables de la arteriogénesis (Carmeliet and Jain, 2011).

3.2.2. VASCULARIZACIÓN TUMORAL

Durante la progresión tumoral, la irrigación del tejido para proveer de oxígeno y nutrientes a las células tumorales es debida a la formación de una compleja red vascular en la que están implicados diferentes mecanismos como: i) la angiogénesis mediada por la proliferación y migración de las propias EC de los vasos preexistentes (Figura 7A); ii) la vasculogénesis producida por la migración, proliferación y diferenciación de EPC a EC (Figura 7B); iii) la división de los vasos preexistentes mediante un proceso denominado intususcepción (Figura 7C); iv) la coaptación o unión de vasos próximos (Figura 7D); v) la alineación de los vasos por células tumorales a través de un proceso conocido como mimetismo vascular (Figura 7E); vi) y la diferenciación de las propias células tumorales en células endoteliales (Figura 7F) (Carmeliet and Jain, 2011).

Respecto al papel de las EPC en la vasculogénesis tumoral, al igual que en los tejidos isquémicos, en los tumores se genera un ambiente hipóxico que induce la producción de HIF-1 α estimulando la expresión de factores pro-angiogénicos como el VEGF y el SDF-1, generándose un gradiente de éstos que median la migración de las EPC desde la médula ósea (Figura 6) (George et al., 2011). Por otro lado, en estos tejidos también se producen otros factores como osteopontina, miembros de la familia de los FGF, CCL2 o CCL5 que, además de participar en otros procesos del desarrollo

tumoral, están implicados de alguna manera en la movilización de las EPC a estos tejidos (Wels et al., 2008). Por otra parte, las EPC reclutadas a estas zonas, a su vez, secretan factores que promueven la angiogénesis, estimulando la proliferación y migración de las células residentes en el tejido (Asahara et al., 2011).

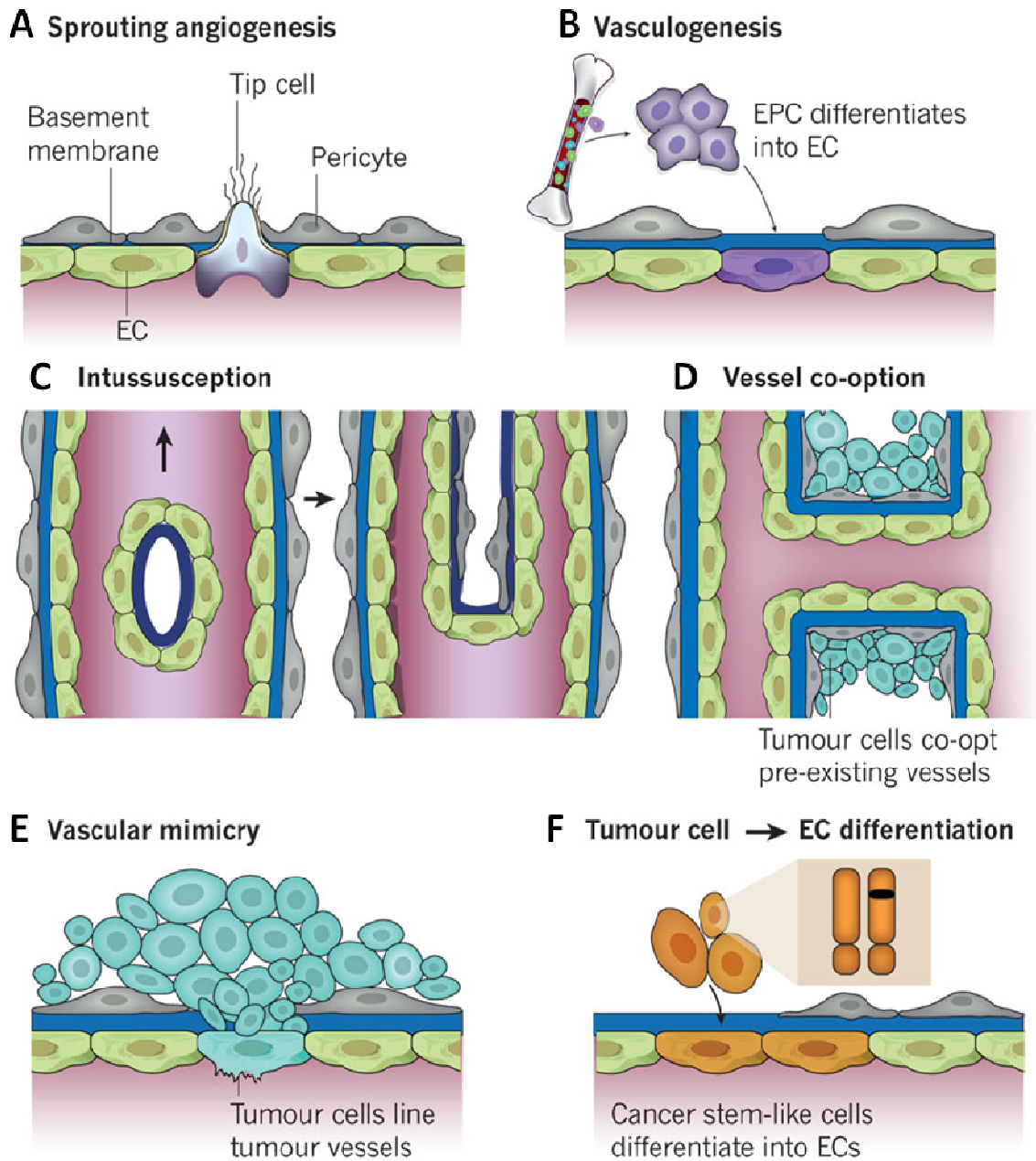


Figura 7. Diferentes mecanismos de formación de vasos sanguíneos en los tumores (Imagen tomada de Carmeliet and Jain, 2011)

4. TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA

4.1. BREVE HISTORIA

Los orígenes de la terapia celular se remontan a mediados del siglo XVII, así pues, entre los años 1656 y 1668 aparecen documentados los primeros estudios relacionados con la transfusión de sangre realizados entre animales y seres humanos, siendo los pioneros de estos trabajos los científicos Richard Lower y Jean-Baptiste Denys (Myhre, 1990), pudiendo ser considerada la transfusión sanguínea como una forma de terapia celular. Por otro lado, los primeros trabajos relacionados con el trasplante de células no sanguíneas datan de 1912, año en que el médico alemán Kuettner empleó la inyección de células tiroideas para tratar a niños que padecían hipotiroidismo, sentando las bases de la terapia celular (Kuettner, 1912).

Uno de los avances más importantes de esta disciplina biomédica se debe a los trabajos de Paul Niehans, un médico suizo que en el año 1931 aplicó la técnica de la disgregación tisular para tratar a un paciente que había sufrido un daño vital en la glándula paratiroides tras una intervención quirúrgica. Niehans disgregó en pequeños trozos la glándula paratiroides extraída de un animal, mezcló los fragmentos obtenidos en una solución salina y los inyectó en el cuello del paciente, consiguiendo su completa recuperación. Tras este descubrimiento comenzó el estudio de la aplicación del trasplante de células frescas para la regeneración tisular, quedando recogidos gran parte de estos trabajos en su libro "Introduction to cellular therapy" publicado en 1960 (Niehans, 1960). Paul Niehans es considerado como el padre de la terapia celular.

La evolución en el conocimiento de la biología de las SC, así como el descubrimiento de los mecanismos responsables de la respuesta inmune ha permitido, sin duda, el gran desarrollo actual de la terapia celular. Hoy día existen metodologías para el adecuado aislamiento y cultivo *in vitro* de las SC, así como para inducir su proliferación y diferenciación a linajes celulares específicos. Además, la identificación de fuentes autólogas de SC ha permitido el trasplante seguro de estas células en el individuo sin riesgo de rechazo inmunológico.

Respecto a la ingeniería de tejidos, los primeros avances relacionados con esta disciplina se remontan a 1933, año en que Bisceglie publicó un trabajo en el que utilizaba una membrana de polímero para envolver células tumorales de ratón con el fin de protegerlas del ataque del sistema inmune al ser implantadas en la cavidad abdominal de un cerdo (Bisceglie, 1933). La utilización de biomateriales para su aplicación en medicina regenerativa tuvo sus comienzos a principios de los años 80, cuando se empezaron a desarrollar estructuras bidimensionales de colágeno o compuestos de colágeno y GAG para el trasplante de injertos de piel (Bell et al., 1981; Burke et al., 1981). Otro paso crucial para el avance de esta disciplina lo supuso el desarrollo de estructuras tridimensionales de materiales biocompatibles, como los “scaffolds”, que permiten el crecimiento de un gran número de células y mejoran la resistencia, las tasas de degradación e incorporan propiedades de reconocimiento celular, permitiendo la creación de tejidos en tres dimensiones (Langer, 2000). Por lo general, los biomateriales que se han utilizado para la ingeniería de tejidos y órganos se pueden dividir en tres clases: i) los materiales de origen natural, como el colágeno y el alginato; ii) las matrices de tejido acelulares, como la submucosa vesical y la submucosa del intestino delgado; iii) y los polímeros sintéticos, tales como el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico y el ácido poliláctico-co-glicólico (Atala, 2012).

4.2. DEFINICIÓN

La medicina regenerativa es una disciplina médica que surge gracias a los avances dentro del campo de la biología de las SC y la biología del desarrollo. El fin de la medicina regenerativa es la recuperación de la funcionalidad perdida, ya sea proporcionando elementos necesarios para la reparación *in vivo*, como estimulando la capacidad de regeneración intrínseca del propio organismo (Greenwood et al., 2006). Un aspecto importante a considerar en referencia a esta rama de la biomedicina, es que se basa en el empleo de los mismos mecanismos que el propio organismo utiliza para su auto-reparación, siendo aspectos críticos para el avance de esta disciplina el desarrollo de metodologías adecuadas para el aislamiento y diferenciación de las SC, así como el descubrimiento de los mecanismos que median su migración, reclutamiento e integración en los tejidos dañados para la recuperación de su funcionalidad (Mironov et al., 2004).

La terapia celular hace referencia al empleo de las propias células para la recuperación de la función perdida. Las células son la principal herramienta de la medicina regenerativa, existiendo una gran variedad de fuentes celulares susceptibles de ser empleadas para estos fines como: células maduras funcionales, células modificadas que producen un agente terapéutico o material genético, las células de los xenotrasplantes, las células transdiferenciadas obtenidas a partir de células diferenciadas del propio paciente, o SC obtenidas tanto de fuentes autólogas como alogénicas (Demirbag et al., 2011). Respecto a la posible aplicación clínica de las SC, es importante considerar su origen. Así, por ejemplo, las ESC y las células iPS, aunque tienen un mayor potencial de diferenciación que las SC de otros orígenes, muestran un mayor riesgo de formación de teratomas y, además, las ESC sólo pueden ser empleadas en trasplantes alogénicos (Brunt et al., 2012). Por otro lado, las SC de origen fetal, perinatal y adulto son susceptibles de ser utilizadas autólogamente, aunque muestran ciertas diferencias respecto a su accesibilidad, capacidad de proliferación o de diferenciación, que son características críticas a considerar a la hora de seleccionar la mejor fuente para su uso clínico (Behr et al., 2010; Zhang et al., 2012c).

Por otra parte, la ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que reúne los principios de las ciencias de la vida y la medicina junto con los de la ingeniería (Polak and Bishop, 2006). Ésta se basa en el desarrollo de biomateriales que sirvan de nichos bioquímicos y biofísicos para el crecimiento de las células, con el fin de que guíen el control de su función y permitan la generación de tejidos funcionales (Chen and Simmons, 2011). Las dos principales estrategias que se utilizan en la ingeniería de tejidos son: i) la implantación de biomateriales con factores bioactivos que tengan la capacidad de atraer las células del organismo y que proporcionen el ambiente espacial adecuado para fomentar la propia habilidad natural del cuerpo para repararse; ii) o el desarrollo de biomateriales que reproduzcan las propiedades biológicas y mecánicas de la ECM natural para el crecimiento y diferenciación *in vitro* de las SC, con el fin de formar nuevos tejidos con una apropiada estructura y función, para su posterior implantación en el organismo. Así pues, este campo de la biomedicina regenerativa emplea aspectos de la biología celular y el trasplante, la ciencia de los materiales y la ingeniería biomédica, para desarrollar sustitutos biológicos que puedan restaurar y mantener la función normal de tejidos y órganos dañados (Atala, 2012).

Actualmente, la medicina regenerativa emplea una gran variedad de estrategias para el restablecimiento de la funcionalidad de los tejidos dañados, aparte de la utilización de SC, ya sea mediante su administración directa en el individuo solas o adheridas a biomateriales, o a través de la generación de tejidos u órganos *ex vivo* para su posterior implantación. Entre estas estrategias se incluyen: la administración de sustancias, tales como fármacos o factores de crecimiento, que estimulan la capacidad de regeneración del propio organismo (Koria, 2012; Roux et al., 2011); la aplicación de la nanotecnología en terapia celular, ingeniería tisular o para la administración de fármacos y genes (Kubinova and Sykova, 2010); la modificación genética de las células para mejorar su viabilidad y su capacidad regenerativa (Cho et al., 2012); la utilización de SC como vehículos para la entrega de genes (Hai et al., 2012); o la ingeniería biomédica y la terapia génica (Messenger and Tomlins, 2011).

Según el glosario de términos relacionados con la terapia celular y la medicina regenerativa publicado por la *British Standards Institution* del departamento de negocios, innovación y habilidades del Reino Unido, la medicina regenerativa, la terapia celular y la ingeniería tisular se definen como (Culme-Seymour and Mason, 2012):

- **Medicina Regenerativa:** Proceso para reemplazar o regenerar las células, tejidos u órganos, con el fin de restaurar o establecer la función normal.
- **Terapia Celular:** Terapia en la que las células se administran al cuerpo para el beneficio del destinatario.
- **Ingeniería Tisular:** Uso de una combinación de células, ingeniería, materiales y métodos para la fabricación *ex vivo* de tejidos u órganos vivos que pueden ser implantados para mejorar o reemplazar las funciones biológicas.

4.3. APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE

En la actualidad hay recogidos en las bases de datos científicas un elevado número de estudios clínicos relacionados con la medicina regenerativa en los que han sido utilizadas SC de diferentes fuentes de origen para el tratamiento de una gran variedad de patologías. En la Tabla 2 se recogen algunos de estos ensayos clínicos

Tabla 2. Ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes patologías mediante el trasplante de células madre (SC)

PATOLOGÍA	FUENTE DE OBTENCIÓN	TIPO DE TRASPLANTE	REFERENCIA
Insuficiencia cardiaca	SC fetales	Alogénico	(Benetti et al., 2010)
Atrofia cerebelosa hereditaria	SC neurales de origen fetal	Alogénico	(Tian et al., 2009)
Síndromes hereditarios de insuficiencia de la médula ósea	Sangre de cordón umbilical	Alogénico	(Bizzetto et al., 2011)
Ataxia hereditaria	Sangre de cordón umbilical	Alogénico	(Yang et al., 2011)
Diabetes tipo 2	MSC de placenta	Alogénico	(Jiang et al., 2011)
Osteoartritis	MSC de médula ósea	Autólogo	(Davatchi et al., 2011)
Lesiones de médula espinal	MSC de médula ósea	Autólogo	(Saito et al., 2008)
Esclerosis múltiple	MSC de médula ósea	Autólogo	(Connick et al., 2012)
Parkinson	MSC de médula ósea	Autólogo	(Brazzini et al., 2010)
Fístula perianal	hASC	Autólogo	(Garcia-Olmo et al., 2009)
Daño tisular post-radioterapia	hASC	Autólogo	(Rigotti et al., 2007)
Inmunodeficiencia genética	HSC	Alogénico	(Cuellar-Rodriguez et al., 2011)
Cardiomiopatía isquémica	SC cardiacas	Autólogo	(Bolli et al., 2011)

realizados en pacientes, representando una pequeña muestra de las posibles aplicaciones clínicas que el trasplante de SC puede tener en el tratamiento de diversas enfermedades. Es importante considerar que al utilizar como términos de búsqueda “stem cells” en la página web *clinicaltrial.gov*, la mayor base de datos de ensayos clínicos del mundo, se obtienen más de 4.000 ensayos registrados. Por otro lado, la búsqueda de los estudios clínicos publicados en la web *Pubmed*, la base de datos mundialmente más relevante en lo referente a publicaciones biomédicas, al introducir los términos de búsqueda “stem cells” y restringiendo la búsqueda a “clinical trial” para el tipo de artículo, aparecen publicados más de 3.000 artículos. La mayoría de estos estudios se basan en la utilización de las SC en trasplantes tanto alogénicos como autólogos, o en el empleo diferentes sustancias para inducir su movilización y reclutamiento a los tejidos que requieren su regeneración.

4.4. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

4.4.1. GENERALIDADES

Las enfermedades cardiovasculares (del inglés “cardiovascular diseases”, CVD) incluyen las enfermedades del corazón, las enfermedades vasculares del cerebro y las enfermedades de los vasos sanguíneos. El principal causante de estos desórdenes es la aterosclerosis, un proceso patológico complejo que se desarrolla por el depósito de materia grasa y colesterol en el interior del lumen de los vasos sanguíneos. Estos depósitos, denominados placas de ateromas o ateromatosas, hacen que la superficie interna de los vasos sanguíneos se vuelvan irregulares y que se estreche su luz, haciendo más difícil que la sangre fluya a través de ellos, volviéndose éstos además menos flexibles. Finalmente, la placa puede romperse, provocando la formación de un coágulo de sangre que, según donde se desarrolle, puede causar por ejemplo un ataque al corazón o un accidente cerebrovascular (Mendis et al., 2011).

La aterosclerosis es causante de las enfermedades isquémicas del corazón, como por ejemplo el AMI; las enfermedades cerebrovasculares (del inglés “cerebrovascular diseases”, CBVD), como los accidentes cerebrovasculares; y las enfermedades de la aorta y otras arterias, como la hipertensión y las enfermedades vasculares periféricas. También se incluyen dentro de las CVD otras enfermedades

que no están relacionadas con la aterosclerosis como las enfermedades congénitas del corazón, las enfermedades reumáticas del corazón, las cardiomiopatías o las arritmias cardíacas (Mendis et al., 2011).

Estas enfermedades tienen un origen multifactorial, siendo clasificados los factores de riesgo cardiovascular como: i) factores de riesgo conductuales, ii) factores de riesgo metabólicos y iii) otros factores de riesgo. Dentro de los factores de riesgo conductuales se incluyen el consumo de tabaco, la inactividad física, una dieta poco saludable rica en sal, grasa y calorías, o el abuso de alcohol. Entre los factores de riesgo metabólicos se encuentran la presión arterial elevada o hipertensión, un elevado contenido de azúcar en la sangre por la diabetes, niveles elevados de lípidos en la sangre como el colesterol, el sobrepeso y la obesidad. Otros factores de riesgo que afectan a la predisposición a sufrir una CVD lo constituyen, por ejemplo, la pobreza y un nivel educativo bajo, una edad avanzada, el género, la predisposición genética o factores psicológicos como el estrés y la depresión, entre otros (Mendis et al., 2011).

Las CVD son las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Según datos del año 2008 de la Organización Mundial de la Salud (del inglés "World Health Organization", WHO) murieron por esta causa 17,3 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo (Figura 8A), 7,3 millones de estas muertes fueron debidas a ataques de corazón y 6,2 millones a accidentes cerebrovasculares (Mendis et al., 2011). Dentro de las CVD, las de mayor prevalencia y que constituyen las principales causas de defunción tanto en hombres como en mujeres son la isquemia cardíaca y las CBVD (Figura 8B-C) (Mendis et al., 2011). Según los últimos datos del Instituto Nacional de Estadística referidos al año 2010, en España las CVD también constituyen la principal causa de mortalidad global con un 31,2% del total de defunciones registradas, aumentando este dato hasta un 37,3% en mayores de 79 años, aunque en los últimos años ha mostrado una tendencia decreciente. Por otro lado, dentro de las CVD, las enfermedades isquémicas del corazón volvieron a ser la primera causa de muerte entre los hombres y las CBVD entre las mujeres (INE, 2012).

Respecto al coste sanitario que generan las CVD, un estudio realizado por la Universidad de Oxford en el año 2006 determinó que estas enfermedades generan un

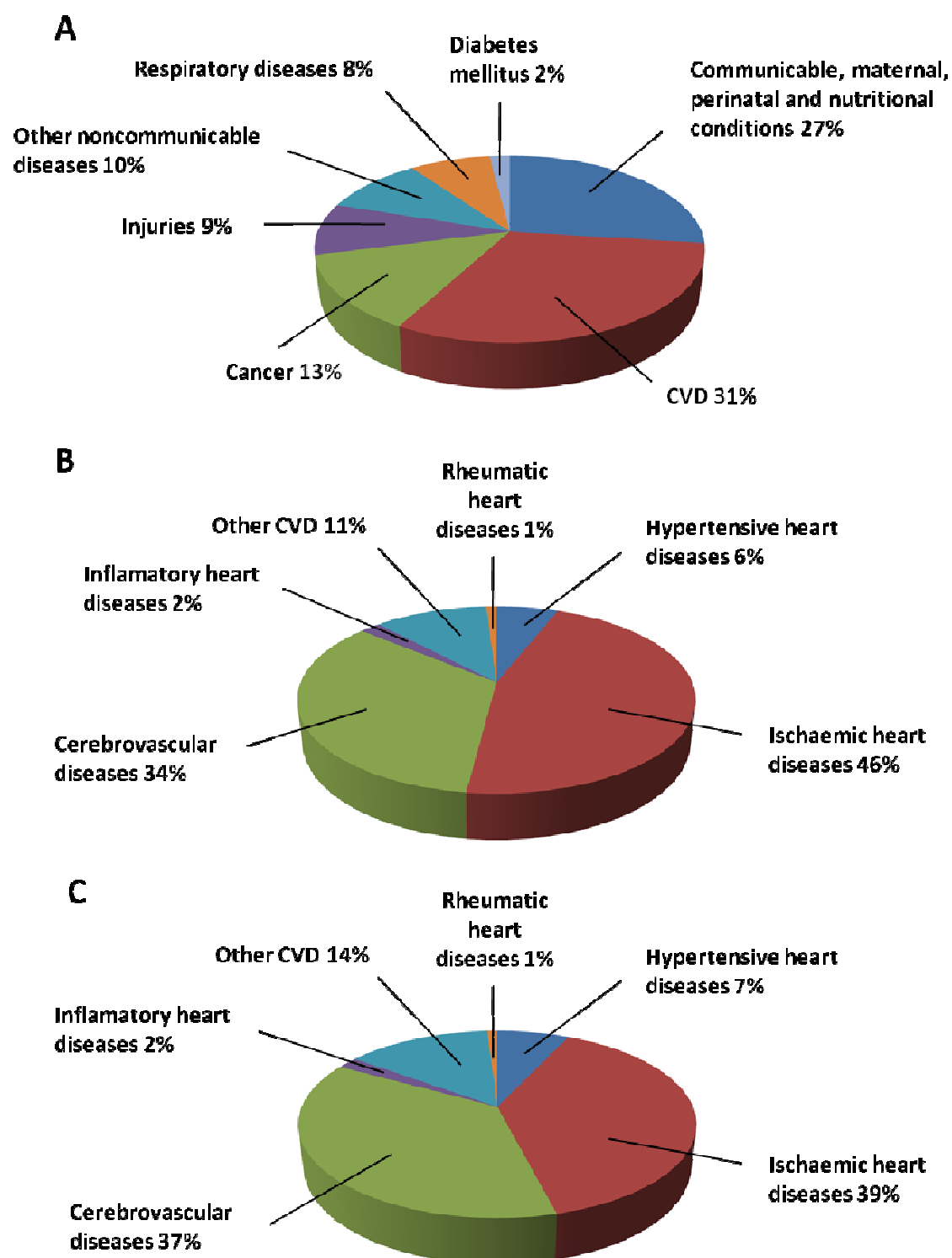


Figura 8. Principales causas de mortalidad en el mundo en el año 2008 (A). Enfermedades cardiovasculares (CVD) responsables de las muertes en hombres (B) y mujeres (C) (Datos obtenidos de Mendis et al., 2011)

gasto sanitario anual de unos 169.000 millones de euros en el conjunto de la Unión Europea, ascendiendo este coste hasta unos 7.000 millones de euros anuales sólo en España. Dentro de estos datos no sólo se incluyen los gastos sanitarios correspondientes al tratamiento de la enfermedad, que se estiman en unos 4.000 millones de euros para el territorio español, sino también los costes indirectos generados por pérdidas de productividad debidas a enfermedad o mortalidad prematura, así como los derivados de los cuidados prestados a los enfermos por personal no profesional del entorno del paciente (Leal et al., 2006).

4.4.2. CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

La cardiopatía isquémica puede definirse como la enfermedad cardíaca y sus complicaciones derivadas producidas como consecuencia de alteraciones fisiopatológicas que conllevan la aparición de un desbalance entre el aporte y demanda de oxígeno del músculo cardíaco. La causa más frecuente de isquemia miocárdica es la enfermedad coronaria debida a aterosclerosis de las arterias coronarias epicárdicas, siendo responsable de más del 90% de estas patologías (Sánchez Pérez et al., 2005). Dentro de este término se engloban diversos síndromes coronarios que pueden clasificarse en: i) crónicos, entre los que se incluyen la ateromatosis sin isquemia, la isquemia silente o la angina estable; ii) o agudos, como pueden ser la angina inestable, el AMI o la muerte súbita (Sánchez Pérez et al., 2005).

Los síndromes coronarios crónicos aparecen como consecuencia de placas de ateromas estables, las cuales se caracterizan por un importante desarrollo de la capa fibrosa de la misma, incluso con calcificación, lo que le confiere resistencia a la ruptura. Episodios de trombosis no oclusiva con posterior organización y fibrosis del trombo contribuyen al aumento de tamaño de la lesión, disminuyendo el calibre del vaso de forma indefinida y provocando una disminución del flujo de oxígeno al miocardio. En ocasiones se llega a la obstrucción completa de la arteria, que pasa desapercibida por progresar lentamente en el tiempo y permitir el desarrollo de circulación colateral (Sánchez Pérez et al., 2005).

Los síndromes coronarios agudos, sin embargo, son producidos por placas ateromatosas inestables, que se caracterizan por un predominio del componente lipídico sobre la fibrosis, por lo que son más susceptibles de sufrir complicaciones. Una

consecuencia de la inestabilidad de la placa es la posibilidad del desarrollo de fracturas o fisuras en la misma, de tal forma que si alcanzan el endotelio suponen la exposición del material subendotelial subyacente a la placa ateromatosa al torrente sanguíneo. Esto induce un estímulo para la adhesión y agregación plaquetaria local, y la subsiguiente activación de la cascada de la coagulación con formación de un trombo, que puede ocasionar la oclusión total o subtotal de la luz arterial de forma brusca, siendo éste el hecho fisiopatológico fundamental en la aparición de los llamados síndromes coronarios agudos. En menos ocasiones, el origen de este tipo de patologías no es la complicación de una placa de ateroma, sino el descenso brusco del aporte de oxígeno provocado, por ejemplo, por una anemia intensa o hipoxemia, o el aumento de las demandas como ocurre en las taquiarritmias (Sánchez Pérez et al., 2005).

En general, cuando la obstrucción de la luz arterial por el trombo no es completa se produce lo que clínicamente se conoce como angina inestable o un AMI sin ascenso del segmento ST, en función del daño isquémico provocado. Aunque generalmente el AMI suele caracterizarse por la oclusión coronaria completa, generándose una necrosis celular irreversible de una zona del miocardio producida por la isquemia grave y prolongada del mismo (Figura 9). La magnitud del daño miocárdico causado depende del territorio que suple el vaso afectado y del tiempo que perdure la oclusión, existiendo factores naturales que pueden producir lisis espontánea temprana del trombo. En algunas ocasiones el AMI se complica y puede provocar muerte súbita (Sánchez Pérez et al., 2005).

La mortalidad por isquemia cardiaca en España es muy baja en comparación con otros países de la región europea, aunque la distribución interna dentro del territorio español no es uniforme, existiendo ciudades en las que sus habitantes muestran un riesgo extremadamente bajo de morir por enfermedad coronaria, siendo estas tasas de mortalidad 40% más bajas que la tasa nacional (Medrano et al., 2012). Aún así, las enfermedades isquémicas del corazón supusieron, de forma global, la primera causa de muerte entre los hombres, constituyendo el 10,2% del total de defunciones, y la segunda en mujeres, con un 8,2%, según los datos recogidos durante el año 2010 en España (INE, 2012).

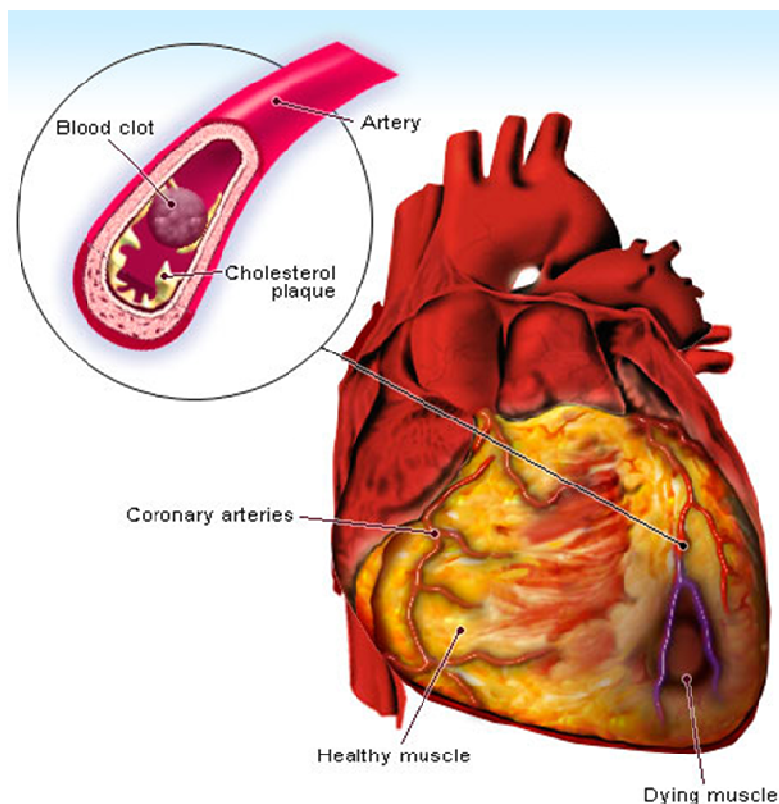


Figura 9. Oclusión de la arteria coronaria y necrosis del tejido subyacente en el infarto agudo de miocardio (AMI) (Imagen tomada de www.medicinenet.com)

4.4.3 ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES

Las CBVD o ictus hacen referencia a un trastorno circulatorio cerebral que ocasiona una alteración transitoria o definitiva de la función de una o varias partes del encéfalo. Este trastorno se produce en un 85% de los casos por un proceso isquémico que provoca una falta de aporte de sangre a una determinada zona del parénquima encefálico (Figura 10A), mientras que el resto son debidos a la rotura de un vaso sanguíneo encefálico con extravasación de sangre fuera del lecho vascular, es decir, a un proceso hemorrágico (Figura 10B) (Ustrell-Roig and Serena-Leal, 2007).

Clínicamente existen cinco subtipos etiopatogénicos de ictus: i) el ictus aterotrombótico por enfermedad de gran vaso, ii) el cardioembólico, iii) el lacunar por enfermedad de pequeño vaso, iv) el de causa inhabitual (dissección arterial, vasculitis, vasoespasmo, etc.), v) y el de etiología indeterminada o criptogénico (Ustrell-Roig and

Serena-Leal, 2007). No obstante, las CBVD pueden ser clasificadas en función de diferentes criterios, como por ejemplo el tamaño de la zona afectada, la evolución de la enfermedad en las primeras horas, el territorio vascular afectado, las manifestaciones clínicas o la localización del proceso hemorrágico.

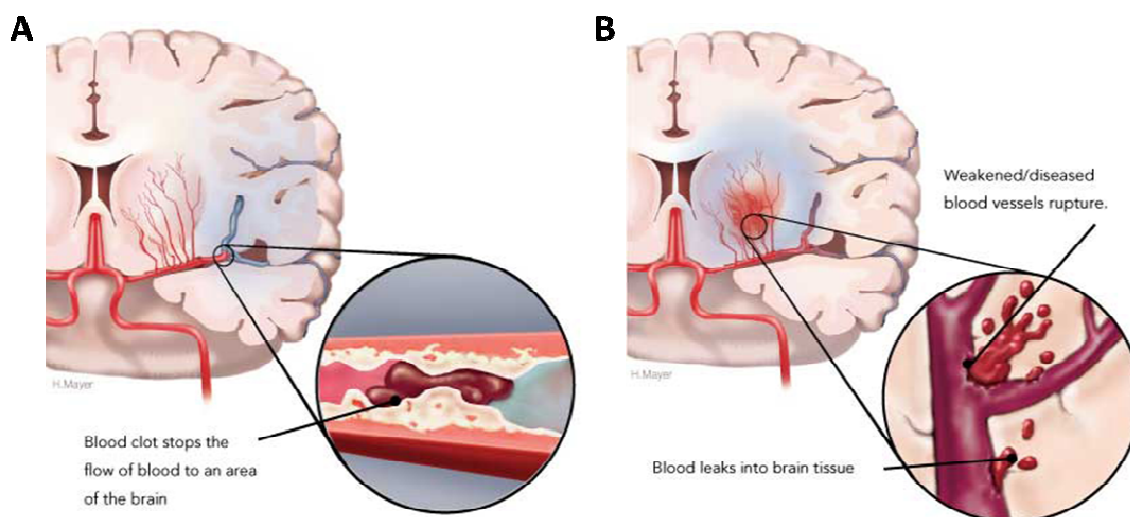


Figura 10. Enfermedad cerebrovascular (CBVD) isquémica (A) y hemorrágica (B)
(Imagen tomada de www.heartandstroke.com)

Así pues, las CBVD isquémicas pueden ser clasificadas según el tamaño de la zona afectada como: i) isquemia global, cuando la disminución del flujo sanguíneo cerebral se produce en todo el encéfalo de manera simultánea debido a una hipotensión arterial marcada; ii) o como isquemia focal, cuando sólo se ve afectado el encéfalo de forma parcial (Diez-Tejedor et al., 2001). En función de la evolución en las primeras horas se habla de; i) accidente isquémico transitorio, si el déficit neurológico se recupera antes de las primeras 24 horas; ii) o de infarto cerebral si se produce lesión definitiva del parénquima cerebral (Diez-Tejedor et al., 2001; Ustrell-Roig and Serena-Leal, 2007). Además, según el territorio vascular afectado, el accidente isquémico transitorio se clasifica en carotídeo, vertebrobasilar e indeterminado, y en función de las manifestaciones clínicas puede ser retiniano, hemisférico cortical, lacunar o atípico (Ustrell-Roig and Serena-Leal, 2007). Por otro lado, los ictus también pueden tener un origen hemorrágico, pudiendo dividirse en hemorragia subaracnoidea, cuando ocurre en el espacio subaracnoideo; o hemorragia cerebral, cuando se produce en el parénquima o en el interior de los ventrículos cerebrales, pudiendo

subdividirse esta última a su vez en función de su localización en hemorragia parenquimatosa o hemorragia ventricular (Diez-Tejedor et al., 2001).

Las CBVD son la segunda causa más común de muerte y estas patologías se encuentran entre las cinco primeras causas de morbilidad en muchos países desarrollados y en desarrollo. Un estudio realizado recientemente sobre la evolución de las tasas de mortalidad debidas a este tipo de enfermedades en 48 países diferentes entre los años 1950 y 2005, determinó grandes variaciones según las áreas geográficas y regionales, achacándose la disminución de la mortalidad observada en muchos países con la aplicación de diversas estrategias de prevención (Mirzaei et al., 2012). En España, según los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística relativos al año 2010, las CBVD supusieron la primera causa de mortalidad en mujeres, representando el 9,5% del total de defunciones registradas, y la segunda en hombres, con un 6,4% de las muertes dentro de este colectivo (INE, 2012). Por otro lado, las CBVD son uno de los motivos más frecuentes de asistencia neurológica urgente y constituyen un grave problema de salud pública ya que suponen la primera causa de discapacidad (Ustrell-Roig and Serena-Leal, 2007).

4.4.4. INSUFICIENCIA CARDIACA

La insuficiencia cardiaca puede ser definida como el estado fisiopatológico en el que algún tipo de alteración de la estructura o función cardiaca conducen a la incapacidad del corazón para suministrar oxígeno a un ritmo acorde con los requisitos metabólicos de los tejidos (McMurray et al., 2012). La insuficiencia cardiaca es generalmente una condición crónica en la cual se registran episodios de empeoramiento de los síntomas que pueden requerir hospitalización o visitas médicas más frecuentes. Por otra parte, ésta puede presentarse de forma aguda, con aparición de síntomas severos en 24 horas, pudiendo mostrarse clínicamente de varias formas como: edema pulmonar agudo secundario a la disfunción cardiaca; shock cardiogénico caracterizado por hipotensión, oliguria y vasoconstricción periférica; o empeoramiento agudo de la insuficiencia cardiaca crónica (Mosterd and Hoes, 2007).

Generalmente, la insuficiencia cardiaca se presenta como una disfunción sistólica del ventrículo izquierdo o insuficiencia cardiaca sistólica. Ésta también puede ocurrir en pacientes con una función sistólica del ventrículo izquierdo normal, es decir,

conservan su fracción de eyección ventricular, pero que requieren mayores presiones de llenado para obtener un volumen diastólico final normal del ventrículo izquierdo, conociéndose como insuficiencia cardiaca diastólica (McMurray et al., 2012; Mosterd and Hoes, 2007). La disfunción sistólica es principalmente causada por una mala adaptación de los miocitos supervivientes y la ECM tras una lesión miocárdica, por ejemplo un AMI. Esto lleva a un remodelado patológico del ventrículo con un deterioro de su capacidad de dilatación y su contractilidad, aunque también la hipertensión y la diabetes pueden contribuir a la aparición de la insuficiencia cardiaca sistólica. Por otro lado, los pacientes con insuficiencia cardiaca diastólica suelen presentar una edad más avanzada y a menudo aparece en mujeres con obesidad, siendo menos propensos a tener enfermedad coronaria y más propensos a tener hipertensión y fibrilación auricular (McMurray et al., 2012).

Según la *New York Heart Association*, en base a la gravedad de los síntomas y la actividad física, pueden distinguirse funcionalmente cuatro clases diferentes de insuficiencia cardiaca: i) Clase I, cuando la actividad física ordinaria no causa una excesiva dificultad respiratoria, fatiga o palpitaciones; ii) Clase II, si en reposo no se aprecian síntomas, pero la actividad física ordinaria provoca una excesiva dificultad respiratoria, fatiga o palpitaciones; iii) Clase III, cuando existe un confort en reposo, pero la realización de cualquier leve actividad física produce una excesiva dificultad respiratoria, fatiga o palpitaciones; iv) y Clase IV, cuando aparecen síntomas en reposo, incrementándose el malestar ante cualquier actividad física (McMurray et al., 2012).

Esta patología se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud pública en los países de nuestro entorno, y es uno de los factores con mayor impacto ocasional en la morbimortalidad de la población general. Su incidencia y su prevalencia parecen ir en ascenso, debido al aumento progresivo de la edad poblacional, la mejora en el cuidado y la supervivencia a enfermedades crónicas diversas; y al hecho de que constituye el estadio final de muchas afecciones cardiacas en las que la supervivencia también se ha visto incrementada (Anguita Sanchez et al., 2008). Aproximadamente el 2% de la población adulta en los países desarrollados tiene insuficiencia cardiaca, incrementándose esta proporción hasta ser $\geq 10\%$ entre las personas de 70 años de edad o mayores (Mosterd and Hoes, 2007).

En España, al igual que en el resto de Europa y Estados Unidos, aunque la mortalidad debida a insuficiencia cardiaca ha ido disminuyendo gracias al avance en los tratamientos aplicados, aún constituye la tercera causa de muerte cardiovascular tanto en mujeres como en varones, tras la cardiopatía isquémica y las CBVD. Según los datos publicados recientemente por el estudio PRICE, la prevalencia de esta enfermedad en nuestro país en personas mayores de 45 años está en torno al 7%, sin que existan diferencias significativas entre hombres y mujeres, aunque sí se produce un aumento en función de la edad (Anguita Sanchez et al., 2008). Además, la insuficiencia cardiaca es la principal causa de hospitalización en mayores de 65 años en España así como en la mayoría de países europeos, y representa el 5% del total de hospitalizaciones en nuestro país, lo que supone una enorme carga sobre los servicios sanitarios y coste a la sociedad, llegando a representar el 2% de todos los gastos sanitarios en algunos países (Banegas et al., 2006).

4.4.5. ENFERMEDADES VASCULARES PERIFÉRICAS

Las enfermedades vasculares periféricas comprenden un variado número de entidades nosológicas que afectan a los sistemas arterial, excluyendo los vasos del corazón e intracraneales, y venolinfático del organismo. Su importancia es creciente, tanto por la gravedad de la morbimortalidad que pueden causar, como por la repercusión socioeconómica y laboral. Además, se ven agravadas por el envejecimiento de la población (Carrasco et al., 2006). Los principales tipos de enfermedades vasculares periféricas son los coágulos sanguíneos, la hinchazón y el estrechamiento y obstrucción de los vasos sanguíneos. Dentro de las enfermedades vasculares periféricas podemos distinguir entre las que afectan a: i) arterias, que pueden ocasionar la enfermedad arterial periférica, la enfermedad arterial cerebrovascular extracraneal, los aneurismas, el pie diabético o el síndrome de Raynaud; ii) venas, entre las que se incluyen las flebitis superficiales y profundas, la embolia pulmonar o las varices; iii) o vasos linfáticos, como la linfangitis aguda o el linfedema (Yara Sánchez, 2008).

La enfermedad arterial periférica incluye al conjunto de cuadros sindrómicos, agudos o crónicos, generalmente derivados de la presencia de una enfermedad arterial oclusiva, que condiciona un insuficiente flujo sanguíneo a las extremidades. En la gran mayoría de las ocasiones, el proceso patológico subyacente es la enfermedad

aterosclerótica, y afecta preferentemente a la vascularización de las extremidades inferiores. Desde el punto de vista fisiopatológico, la isquemia de los miembros inferiores puede clasificarse en: i) funcional, cuando el flujo sanguíneo es normal en reposo pero insuficiente durante el ejercicio; ii) y crítica, si la reducción del flujo sanguíneo ocasiona un déficit de perfusión en reposo, provocando dolor o lesiones tróficas en la extremidad (Serrano Hernando and Martin Conejero, 2007).

Según la clasificación clínica de Leriche-Fontaine, la isquemia crónica de los miembros inferiores puede ser de: i) Grado I, asintomática pero detectable por índice tobillo-brazo $<0,9$; ii) Grado IIa, si se presenta claudicación intermitente no limitante para el modo de vida del paciente; iii) Grado IIb, cuando aparece claudicación intermitente limitante para el paciente; iv) Grado III, manifestada por dolor o parestesias en reposo; v) o Grado IV, si se desarrolla gangrena o lesiones tróficas. Además, también suele ser utilizado el término isquemia crítica, que se define como una isquemia en la que potencialmente puede perderse una extremidad o parte de ella, pudiendo ser incluida en la clasificación anterior como Grado III o Grado IV (Serrano Hernando and Martin Conejero, 2007).

La evolución clínica de la enfermedad arterial periférica es bastante estable debido al desarrollo de circulación colateral, a la adaptación metabólica de las masas musculares implicadas y al uso, muchas veces inconsciente, de grupos musculares no isquémicos. Este tipo de patologías afectan en España a un 15-20% de los sujetos mayores de 70 años, mostrando mayor prevalencia en varones que en mujeres, sobre todo en la población más joven, ya que en edades más avanzadas prácticamente no se detectan diferencias entre ambos grupos. Por otro lado, la principal causa de muerte tardía en los pacientes con enfermedad arterial periférica es la cardiopatía isquémica, alcanzando hasta un 50% de las muertes en estos pacientes (Serrano Hernando and Martin Conejero, 2007).

4.5. USO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las principales estrategias desarrolladas para la curación o el alivio de las CVD se basan principalmente en la utilización de medios farmacológicos o quirúrgicos, pero, desde la observación en 1997 de la existencia en el individuo adulto de una

población de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺/KDR⁺ con capacidad de diferenciarse *ex vivo* en células endoteliales (Asahara et al., 1997) y el posterior descubrimiento de que estas EPC circulantes derivaban de la médula ósea (Asahara et al., 1999a; Shi et al., 1998), estas células han sido propuestas como firmes candidatas en la investigación de terapias celulares para el tratamiento de CVD.

Se ha sugerido que la concentración de EPC circulantes en sangre periférica puede ser un marcador de riesgo cardiovascular y de la función endotelial. En este sentido, diferentes estudios demuestran que tanto el número como la actividad migratoria y funcionalidad de las EPC es significativamente menor en sujetos con hipercolesterolemia, hipertensión o diabetes, así como en fumadores y en personas de avanzada edad. Todos estos son factores de riesgo cardiovascular, pudiendo ser utilizado este valor como marcador pronóstico de posibles eventos cardiovasculares (Bakogiannis et al., 2012; Balbarini et al., 2007; Fadini et al., 2012; Sen et al., 2011). Los niveles de EPC circulantes han sido medidos en personas afectadas por diferentes patologías cardiovasculares, habiéndose observado un aumento de EPC circulantes en los primeros estadios tras una cardiopatía isquémica (Massa et al., 2005; Porto et al., 2011) o un accidente cerebrovascular (Sobrino et al., 2012b), así como cuando se produce una lesión cerebral traumática severa (Gong et al., 2012). Este incremento se ha relacionado con un aumento de los niveles de VEGF, SDF-1 y de la actividad MMP-9. Por otro lado, los niveles sanguíneos de EPC se ven reducidos en pacientes con enfermedad coronaria estable (Huang et al., 2011), enfermedades vasculares periféricas (Smadja et al., 2012), artritis reumatoide (Yiu et al., 2010), enfermedad renal (Watorek et al., 2011) o enfermedades pulmonares crónicas (Fadini et al., 2006), entre otras.

Actualmente, las investigaciones para la aplicación clínica de las EPC en el tratamiento de CVD siguen tres líneas principales: i) el desarrollo de tratamientos que actúen sobre la capacidad de movilización, proliferación y/o funcionalidad de las EPC del paciente, ii) el trasplante celular iii) y la ingeniería tisular. En algunos casos, se ha recurrido a la combinación de varias de estas estrategias para mejorar la salud del paciente.

Con respecto al desarrollo de fármacos, hasta la fecha se han descrito diversos tratamientos que repercuten favorablemente en los pacientes afectados por diversas

patologías cardiovasculares, mediante la estimulación de la capacidad regenerativa intrínseca de las EPC del propio paciente. Algunas de las sustancias empleadas son, por ejemplo: fármacos de la familia de las estatinas como la atorvastatina (Sobrinho et al., 2012a), la simvastatina (Landmesser et al., 2005) o la rosuvastatina (Pirro et al., 2009); péptidos miméticos de la apolipoproteína A-I como el D-4F (Zhang et al., 2012b); análogos de la prostaciclina como el iloprost (Di Stefano et al., 2008); agonistas de PPAR- γ como la pioglitazona (Werner et al., 2007); la eritropoyetina o análogos de esta hormona glicoproteica (Tilling et al., 2012; Yip et al., 2011); inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEi) y antagonistas del receptor de angiotensina (ATRA) (Min et al., 2004; Pelliccia et al., 2010). También han sido utilizados factores como el G-CSF o el GM-CSF para la movilización y el reclutamiento de células progenitoras a una determinada zona de isquemia o de daño vascular (Engelmann et al., 2006; Subramaniyam et al., 2009; Zhao et al., 2011b), e incluso algunos estudios han utilizado terapia génica para inducir la movilización de las EPC, por ejemplo mediante la administración intracoronaria de un vector adenoviral codificante para HGF (Yang et al., 2009).

En lo que se refiere al trasplante de EPC, se sabe que estas células son reclutadas a los sitios de lesión vascular para participar en la reparación de tejidos dañados y en la neovascularización cuando se producen procesos isquémicos, gracias al reclutamiento y diferenciación de estas células mediada por la expresión de HIF-1 α y la liberación de SDF-1 y VEGF principalmente (Figura 6) (Fraisl et al., 2009; George et al., 2011; Oh et al., 2010). Actualmente existen publicados diversos informes de ensayos clínicos basados en el trasplante de EPC para el tratamiento de diferentes CVD, en los que han sido utilizadas para la neovascularización y regeneración de tejidos isquémicos (Tabla 3), proporcionando evidencias de la viabilidad y la seguridad del trasplante de estas células, así como de su utilidad para el tratamiento de estas patologías. Sin embargo, uno de los aspectos críticos para la aplicación de las EPC en terapia celular es la necesidad de desarrollar estrategias adecuadas para su correcto aislamiento y su expansión *ex vivo* (Asahara et al., 2011).

Respecto a la ingeniería tisular, una estrategia que se está actualmente desarrollando consiste en la implantación de biomateriales para la creación de un entorno adecuado para la regeneración del tejido dañado, lo que es conocido como ingeniería tisular *in situ* (Eschenhagen et al., 2012). Algunos estudios realizados en

Tabla 3. Ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes patologías cardiovasculares mediante el trasplante de células progenitoras endoteliales (EPC)

REFERENCIA	PATOLOGÍA	ESTRATEGIA TERAPÉUTICA
(Pasquet et al., 2009)	AMI	Infusión intracardiaca de EPC recolectadas de sangre periférica previa movilización con G-CSF
(Kang et al., 2011)	AMI	Infusión intracardiaca de EPC recolectadas de sangre periférica previa movilización con G-CSF, con y sin inyección subcutánea de un análogo de la eritropoyetina
(Leistner et al., 2011)	AMI	Infusión intracoronaria de EPC obtenidas de sangre periférica o células progenitoras aisladas de médula ósea previamente expandidas <i>ex vivo</i>
(Bartunek et al., 2005)	AMI	Infusión intracoronaria de EPC aisladas de médula ósea
(Stamm et al., 2007)	Cardiopatía isquémica crónica	Infusión intracoronaria de EPC aisladas de médula ósea
(Flores-Ramirez et al., 2010)	Insuficiencia cardiaca crónica	Infusión intracardiaca de EPC recolectadas de sangre periférica previa movilización con G-CSF
(Losordo et al., 2011)	Angina refractaria	Infusión intracardiaca de EPC recolectadas de sangre periférica previa movilización con G-CSF
(Lara-Hernandez et al., 2010)	Isquemia crítica de miembros	Infusión intramuscular de EPC recolectadas de sangre periférica previa movilización con G-CSF
(Kawamoto et al., 2009)	Isquemia crítica de miembros	Infusión intramuscular de EPC recolectadas de sangre periférica previa movilización con G-CSF
(Wang et al., 2007b)	Hipertensión arterial pulmonar idiopática	Infusión de EPC autólogas obtenidas de sangre periférica previamente expandidas <i>ex vivo</i>

modelos animales para la regeneración cardiaca están basados en el empleo de nanofibras (Webber et al., 2010), alginato (Landa et al., 2008) o “scaffolds” de ECM cardiaca (Godier-Furnemont et al., 2011). Actualmente se están llevando a cabo dos estudios clínicos en los que se está aplicando la inyección de alginato en pacientes que han sufrido un AMI (*clinicaltrial.gov*, identificador NCT01226563 / NCT01311791) (Eschenhagen et al., 2012). También se están realizando diversos estudios centrados en la implantación de captadores de EPC circulantes en los sitios de isquemia, por ejemplo, mediante el uso de stents coronarios recubiertos de anticuerpos que reconocen antígenos específicos como el CD34 (Bystron et al., 2010; den Dekker et al., 2011).

Otra variante de la ingeniería tisular se basa en la generación de estructuras tisulares *in vitro*, mediante el crecimiento de las células sobre estructuras compuestas de biomateriales, para su posterior implantación en el tejido dañado. En este sentido, por ejemplo, se han conseguido generar tejidos cardiacos bidimensionales, habiéndose demostrado que pueden ser adheridos al corazón latiente del paciente sin necesidad de utilizar suturas o pegamentos (Sawa et al., 2012). Aunque, sin duda, la finalidad de la ingeniería tisular pretende la construcción de tejidos tridimensionales bioartificiales funcionales para su implantación, siendo las estructuras más utilizadas para este fin matrices sólidas (Critser et al., 2010), matrices compuestas de hidrogeles (Allen et al., 2011) o matrices obtenidas de tejidos naturales descelularizados (Zhu et al., 2008a).

5. CÁNCER

5.1. DEFINICIÓN

El cáncer abarca un grupo heterogéneo de trastornos con propiedades biológicas muy diferentes, aplicándose este término general para definir a aquellas enfermedades caracterizadas por un crecimiento anormal e incontrolado de las células de un tejido u órgano que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos a través del sistema linfático y la circulación sanguínea mediante un proceso conocido como metástasis (Boyle and Levin, 2008).

El cáncer también es denominado como tumor maligno o neoplasia maligna. El término griego neoplasia significa nuevo crecimiento, y hace referencia a la proliferación anormal y descontrolada de las células en un tejido u órgano. La mayoría de las neoplasias proliferan para formar masas distintas, los tumores, siendo caracterizadas las neoplasias malignas o tumores malignos por un alto grado de anaplasia e invasividad (Boyle and Levin, 2008). Dentro del proceso del desarrollo del cáncer o carcinogénesis, se denomina tumorigénesis u oncogénesis a la transición de una célula normal a una célula tumoral capaz de iniciar un tumor, mientras que se denomina progresión tumoral a la transición del tumor hacia la metástasis y, a menudo, la adquisición de resistencia del cáncer al tratamiento (Chung et al., 2010b).

5.2. EPIDEMIOLOGÍA

Según los últimos datos recopilados por el proyecto GLOBOCAN, que tiene como objetivo proporcionar las estimaciones actuales de incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer, en el año 2008 se registraron aproximadamente 12,6 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo, y 7,6 millones de muertes fueron debidas a esta enfermedad (Ferlay et al., 2008), representando la segunda causa de mortalidad por enfermedad a nivel mundial, tras las CVD, y constituyendo el 13% de las muertes registradas en el año 2008 (Figura 8A) (Mendis et al., 2011). Los tipos de cáncer más frecuentes difieren entre los países desarrollados y en vías de desarrollo, así como entre hombres y mujeres (Figura 11A-B). No obstante, de forma global, los cinco tipos de cáncer con mayor incidencia en la población mundial son: el de pulmón, el de mama, el colorrectal, el de estómago y el de próstata (Ferlay et al., 2008).

En España, las neoplasias constituyen la segunda causa de mortalidad, representando un 28,1% del total de defunciones registradas en el año 2010 según los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística, alcanzando un 42,7% del total al considerar el grupo de edad comprendido entre 40 y 79 años. Por otro lado, estas enfermedades supusieron la principal causa de mortalidad en hombres por delante incluso de las CVD y, además, muestran una tendencia ascendente en los últimos años (INE, 2012). Los tipos de cáncer con más incidencia entre los varones en nuestro país lo constituyen el de próstata, con un 21,1% del total de casos registrados en el año 2008; el de pulmón, con un 16,8%; y el colorrectal, con un 13,9%; mientras que los de mayor frecuencia en mujeres son el de mama, que representa el 28,5% de

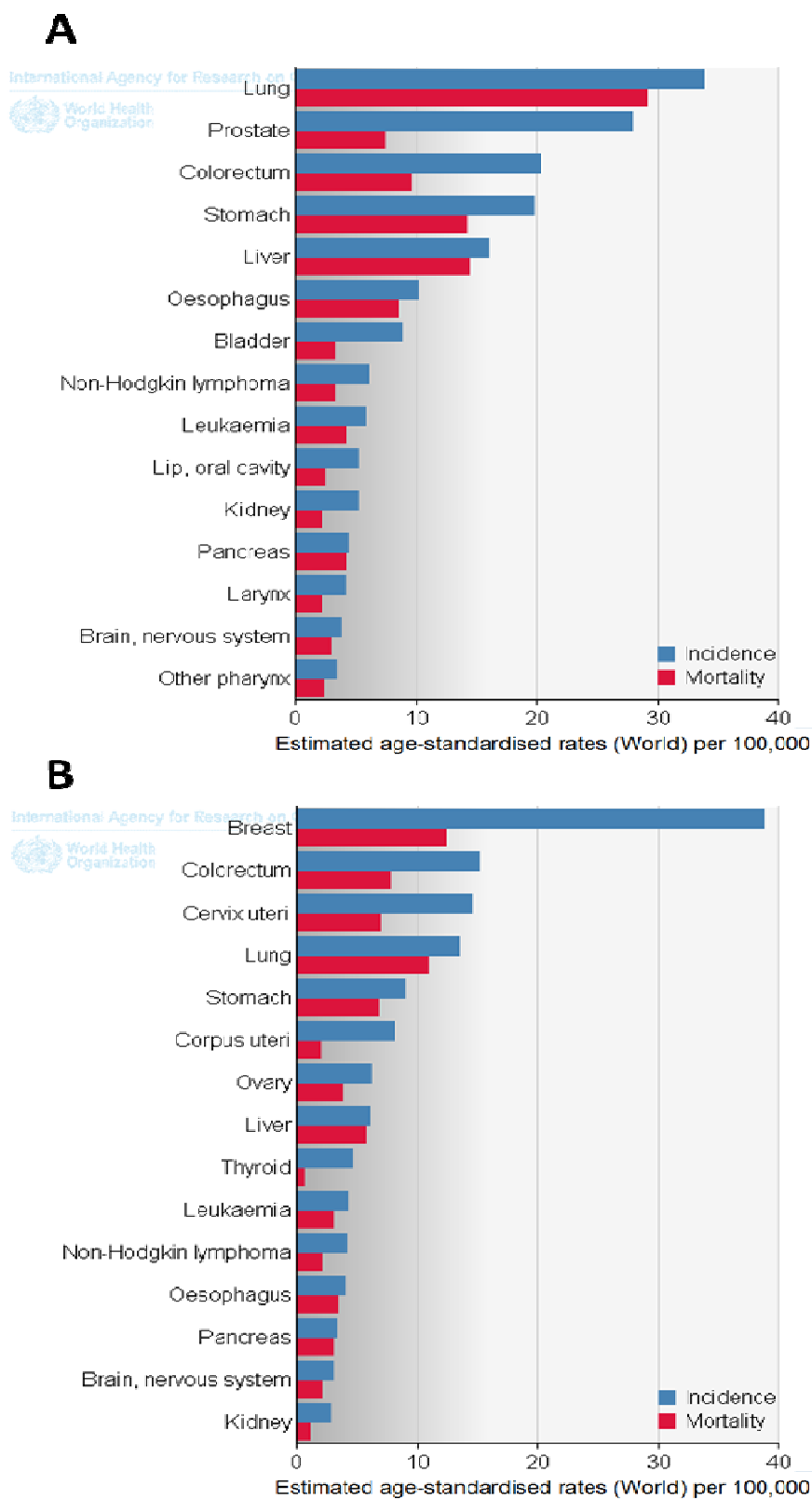


Figura 11. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial en varones (A) y mujeres (B) (Imagen tomada de Ferlay et al., 2008)

todos los tipos de cáncer registrados; el colorrectal, con un 15,4%; y el cáncer del cuerpo uterino, con un 5,7%. Por otro lado, el cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por esta enfermedad en varones en España, seguido del colorrectal y el de próstata; mientras que en mujeres, la principal causa de defunción por neoplasias es debida al cáncer de mama, seguido del colorrectal y el de pulmón (Ferlay et al., 2008).

La incidencia del cáncer ha ido aumentando en los últimos años y se prevé que seguirá esta progresión ascendente debido al crecimiento de la población mundial (Boyle and Levin, 2008). Según las estimaciones previstas por las Naciones Unidas, a mediados de este siglo la población mundial aumentará desde los aproximadamente 7.000 millones de habitantes que existen en la actualidad hasta unos 9.300 millones, superándose los 10.000 millones de habitantes a finales de este siglo, debido principalmente al crecimiento poblacional de las regiones en desarrollo (UN, 2011). Por otro lado, el envejecimiento es otro factor fundamental para el desarrollo del cáncer. La incidencia de cáncer aumenta espectacularmente con la edad, probablemente debido a una acumulación de riesgos de cánceres específicos, combinado con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder su eficacia cuando la persona envejece (Boyle and Levin, 2008). El aumento demográfico esperado para los próximos años también prevé un envejecimiento de la población, estimándose para las próximas décadas un aumento anual del 2,44% de las personas mayores de 60 años y un incremento del 3,35% anual del número de personas que superen los 80 años de edad. Este incremento será mayor en los países en desarrollo para ambos grupos de edad. Estos datos implican un aumento del 12,7% actual a un 25,8% de la población por encima de los 60 años de edad en el mundo para el año 2050 (UN, 2011). Además, independientemente del aumento demográfico y del envejecimiento de la población, también se ha observado un incremento de las tasas de incidencia de esta enfermedad, lo que implica un aumento progresivo de la aparición de nuevos casos de cáncer en el futuro (Boyle and Levin, 2008).

5.3. ETIOLOGÍA

La transformación desde una célula normal hasta una célula tumoral es un proceso escalonado, que conlleva típicamente una progresión desde una lesión precancerosa hasta un tumor maligno. Estos cambios son el resultado de la

interacción entre factores genéticos de la persona y factores ambientales (Roy et al., 2010a). Dentro de estos factores ambientales se incluyen productos químicos, mezclas complejas, exposiciones ocupacionales, agentes físicos, agentes biológicos y factores relacionados con el estilo de vida (IARC, 2012). Especialmente importantes son los denominados carcinógenos, agentes externos que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer, que pueden subdividirse en tres categorías principales: i) carcinógenos físicos, ii) carcinógenos químicos y iii) carcinógenos biológicos (Baba and Câtoi, 2007).

Entre los carcinógenos físicos se incluyen diferentes tipos de radiaciones ionizantes y no ionizantes. Las principales radiaciones no ionizantes son la radiación ultravioleta (UV), la radiación visible y la radiación infrarroja, teniendo todas ellas como fuente principal el Sol. Este tipo de radiaciones muestran un bajo poder de penetración, por lo que representan un peligro real para los ojos y la piel (Baba and Câtoi, 2007). De todas ellas, la radiación UV es la de mayor poder carcinogénico, habiéndose demostrado que la exposición a este tipo de radiación incrementa significativamente el riesgo de padecer cáncer de piel (IARC, 2012). A este grupo también pertenecen otros tipos de radiaciones, como los campos de radiofrecuencia y de microondas, los campos de muy baja frecuencia o los campos eléctricos estáticos y magnéticos (Boyle and Levin, 2008), algunas de las cuales son sospechosas de tener un efecto carcinogénico para el ser humano (IARC, 2012). En relación a las radiaciones ionizantes, éstas pueden ser subdivididas en dos grupos: i) las radiaciones directamente ionizantes, que son partículas cargadas eléctricamente, como las partículas alfa y beta; ii) y las radiaciones indirectamente ionizantes, que son partículas sin carga eléctrica que pueden producir radiaciones directamente ionizantes al interaccionar con la materia, como los rayos-X y rayos-γ (Baba and Câtoi, 2007). Todas estas radiaciones son consideradas como carcinógenas, y se ha demostrado que la exposición a éstas incrementa el riesgo de padecer una gran variedad de neoplasias, como leucemia, cáncer de mama, cáncer colorrectal o de tiroides, entre otros (Boyle and Levin, 2008; IARC, 2012).

Respecto a los carcinógenos químicos, éstos fueron inicialmente identificados por la observación de la existencia de una relación entre determinados tipos de cáncer y ciertas ocupaciones profesionales que implicaban la exposición a determinadas sustancias, como el hollín o el alquitrán (Baba and Câtoi, 2007). En la actualidad,

diversos estudios han corroborado el efecto carcinogénico de multitud de sustancias como las aflatoxinas, el arsénico, los asbestos, el formaldehído y el benceno entre muchos otros (IARC, 2012). Estas sustancias pueden ser clasificadas en tres grupos en función de su mecanismo de acción: i) carcinógenos de acción directa, cuya estructura les confiere la capacidad de inducir cáncer sin una activación metabólica anterior en el organismo huésped; ii) pro-carcinógenos, grupo que incluye a la mayoría de los carcinógenos químicos que requieren una activación metabólica previa; iii) y co-carcinógenos, que son sustancias químicas que no pueden inducir el cáncer cuando se administran solas, pero pueden aumentar el efecto carcinogénico de otras sustancias (Baba and Cătoi, 2007).

El humo del tabaco es la fuente más común de agentes carcinógenos químicos para los seres humanos, y se estima que el tabaquismo es responsable de aproximadamente el 30% de casos de cáncer en los países de altos recursos económicos. El humo del tabaco contiene cerca de 4.800 compuestos diferentes, de los cuales 66 son carcinógenos. De éstos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas específicas del tabaco son los más importantes, aunque también presenta otras sustancias carcinógenas como aminas aromáticas, metales pesados y benceno. El consumo de tabaco causa 13 tipos de cáncer, aunque el de pulmón es el más relevante entre todos los cánceres atribuibles al tabaquismo. Otras fuentes importantes de carcinógenos químicos, aparte del humo del tabaco, lo representan las bebidas alcohólicas y la contaminación ambiental. Recientemente se ha establecido una relación causal entre el consumo de alcohol y el riesgo de padecer cáncer colorrectal y de mama (Boyle and Levin, 2008; IARC, 2012).

Dentro de los carcinógenos biológicos se incluyen las infecciones por determinados virus, bacterias o parásitos (Boyle and Levin, 2008). Según un reciente estudio realizado en base a los datos recogidos durante el año 2008, alrededor de 2 millones del total de 12,7 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, es decir, un 16,1%, fueron atribuibles a infecciones. Esta fracción fue mayor en los países menos desarrollados que en los países más desarrollados, representando un 22,9% y un 7,4% respectivamente. De todos estos casos, aproximadamente el 95% se asociaron a infecciones por *Helicobacter pylori*, por virus de la hepatitis B y C, y por virus del papiloma humano (de Martel et al., 2012).

Como se ha comentado anteriormente, el consumo de tabaco y alcohol son factores muy importantes de riesgo de cáncer, aunque también lo constituyen otros factores relacionados con el estilo de vida como una dieta poco saludable, la obesidad y la inactividad física (Boyle and Levin, 2008). En este sentido, diferentes estudios demuestran que la obesidad y el consumo de alcohol aumentan el riesgo de padecer determinados tipos de cáncer. Por otro lado, la actividad física reduce la incidencia de diferentes tipos de cáncer, y también contrarresta algunos de los efectos adversos de los tratamientos contra el cáncer, atenúa la progresión de la enfermedad y reduce el riesgo de recurrencia, aparte de aportar otros beneficios para la salud (Davies et al., 2011). Además, otros factores relacionados con el riesgo de cáncer lo constituyen determinados factores reproductivos y las hormonas, tanto endógenas como exógenas. Éstos están fuertemente implicados en la etiología de los cánceres de mama, de endometrio, de ovario y de cuello uterino en mujeres (Boyle and Levin, 2008).

Diferentes organismos nacionales e internacionales mantienen programas para la identificación de nuevos carcinógenos, como la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), que clasifica a éstos en función de su carcinogenicidad para el ser humano en cinco categorías: i) Grupo 1, agentes carcinogénicos; ii) Grupo 2A, agentes probablemente carcinogénicos; iii) Grupo 2B, agentes posiblemente carcinogénicos; iv) Grupo 3, agentes no clasificables en cuanto a su carcinogenicidad; v) y Grupo 4, agentes probablemente no carcinogénicos (IARC, 2012).

Por otro lado, se ha observado que algunos cánceres tienen un componente hereditario y tienden a mostrar una agregación familiar, aunque se estima que sólo un 5-10% de casos de cáncer son debidos a mutaciones heredadas en la línea germinal (Roy et al., 2010a). La susceptibilidad genética a padecer cáncer se centra en el estudio de variaciones genéticas heredadas y su asociación con el riesgo de cáncer. En este sentido, multitud de estudios reflejan que algunos polimorfismos genéticos en determinados genes aumentan el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer (Dong et al., 2008). Estos genes de susceptibilidad al cáncer suelen ser principalmente oncogenes, genes supresores de tumores o genes modificadores del riesgo de cáncer. Esta susceptibilidad genética puede ser considerada como una variable continua, puesto que, según las variaciones genéticas que se muestren en el individuo, el riesgo

de cáncer puede variar gradualmente desde un alto riesgo, a un riesgo intermedio o un riesgo bajo (Boyle and Levin, 2008). Diversos genes de susceptibilidad han sido identificados y relacionados con el riesgo de padecer diversos tipos de cáncer tales como de mama, colorrectal, de próstata, de pulmón o de vejiga, entre otros (Dong et al., 2008).

5.4. CARCINOGENESIS

La carcinogénesis es un proceso escalonado, durante el cual las células experimentan profundos cambios metabólicos y de comportamiento que conducen a una proliferación excesiva y de manera prematura, permitiéndoles escapar de la acción del sistema inmune y, finalmente, invadir tejidos distantes para formar metástasis (Boyle and Levin, 2008; Merlo et al., 2006). El desarrollo del cáncer es impulsado por la acumulación de alteraciones que afectan a la estructura y función del genoma, siendo igualmente importantes en este proceso las alteraciones genéticas y los cambios epigenéticos. Mientras que las primeras alteran los patrones normales de expresión de los genes, que a veces conducen a la expresión de proteínas anormales constitutivamente activas, los cambios epigenéticos implican la desregulación de los mecanismos que controlan por ejemplo la transcripción genética, conduciendo al silenciamiento inapropiado o activación de genes asociados con el cáncer. Ambos tipos de cambios son heredables a nivel celular, contribuyendo así a la expansión clonal de las células cancerosas (Herceg and Hainaut, 2007).

Respecto a las modificaciones genéticas, éstas pueden ser debidas a mutaciones puntuales, pudiendo estar limitadas al cambio en una sola base que provoque el reemplazamiento de un único aminoácido, afectando a la función de la proteína codificada por el gen mutado (Boyle and Levin, 2008). También, mutaciones puntuales debidas a pequeñas deleciones o inserciones en la secuencia del DNA de un gen, pueden derivar en una alteración de la funcionalidad de la proteína codificada por éste (Chung et al., 2010b). Otras veces, la alteración de la secuencia de DNA puede afectar a un gran número de bases, como en el caso de las deleciones, las amplificaciones o las traslocaciones cromosómicas, las cuales pueden provocar la pérdida de proteínas, la síntesis de proteínas aberrantes, la formación de nuevas proteínas por la fusión de segmentos no contiguos de DNA o modificar los patrones de

expresión de las proteínas al verse los genes sometidos al control de promotores diferentes al silvestre (Boyle and Levin, 2008; Chung et al., 2010b).

Sin embargo, no sólo los cambios genéticos afectan al desarrollo de esta enfermedad, también los cambios epigenéticos pueden ser responsables de la aparición o progresión del cáncer. La epigenética define todos los cambios heredables en la expresión génica y estructura de la cromatina que no están codificados en la secuencia de DNA en sí (Herceg and Hainaut, 2007). Los mecanismos epigenéticos juegan un papel crucial en la diferenciación celular, el desarrollo embrionario y la adaptación celular a factores ambientales, aunque las alteraciones epigenéticas también están involucradas en la iniciación, promoción y progresión del cáncer (Deng et al., 2010). La metilación del DNA es una de las modificaciones epigenéticas más estables en las células de los mamíferos, siendo especialmente importantes las regiones ricas en citosina-fosfo-guanina (CpG) localizadas en los promotores génicos, que son denominadas como “islas CpG” (Baylin and Jones, 2011). Otro mecanismo involucrado en los cambios epigenéticos relacionados con el cáncer lo constituye la expresión de microRNA (miRNA), RNA no codificantes de proteínas que se unen a RNA mensajeros específicos (mRNA) regulando su expresión (Cho, 2012). También los cambios en la conformación de la cromatina debidos a modificaciones de las histonas pueden producir alteraciones en la expresión de proteínas, activándose la transcripción de genes que no deberían expresarse o produciéndose el silenciamiento de genes que en condiciones normales se expresarían (Wang et al., 2007a).

Para que una célula se vuelva cancerosa, tiene que adquirir ciertas características, entre las que se encuentran principalmente: i) el mantenimiento de una señalización proliferativa, ii) la evasión de los mecanismos supresores del crecimiento, iii) la resistencia a la muerte celular, iv) la inmortalidad replicativa, v) la inducción de la angiogénesis, vi) y la activación de su capacidad de invasión y metástasis (Figura 12) (Hanahan and Weinberg, 2011). Además, en los últimos años se han descrito dos nuevas características de las células cancerosas que pueden unirse a las anteriormente citadas como son: vii) la reprogramación del metabolismo energético, viii) y la capacidad de evadir su destrucción por el sistema inmune (Figura 12) (Kroemer and Pouyssegur, 2008). En adición a estas características, diversos estudios han demostrado que, en los primeros estadios de las neoplasias, las células muestran ciertas características que, a su vez, permiten la adquisición de las características

mencionadas anteriormente, como son: ix) la inestabilidad genómica y el incremento de las tasas de mutación (Negrini et al., 2010); x) y la inducción de procesos inflamatorios (Figura 12) (Grivennikov et al., 2010).



Figura 12. Principales características de las células cancerosas
(Imagen modificada de Hanahan and Weinberg, 2011)

Otra particularidad de las células cancerosas que, si bien no es responsable de la iniciación del tumor, permite su supervivencia, es debida a diversos estados de estrés que pueden sufrir estas células como por ejemplo: estrés por daño en el DNA, estrés mitótico, estrés proteotóxico, estrés metabólico y estrés oxidativo. Los cambios a nivel celular provocados por este tipo de situaciones aparecen en muchos tipos de tumores, aunque también en células no cancerígenas ante diversas situaciones como, por ejemplo, procesos inflamatorios crónicos, y son denominadas colectivamente como los fenotipos de estrés de las células cancerígenas (Luo et al., 2009). Por otro lado, además de las células cancerígenas, los tumores muestran otra dimensión de complejidad, ya que las células normales asociadas a éstos contribuyen ostensiblemente a la adquisición de los rasgos distintivos de las células cancerosas mediante la creación del “microambiente del tumor” (Hanahan and Weinberg, 2011).

5.4.1. MANTENIMIENTO DE LA SEÑALIZACIÓN PROLIFERATIVA

Las células cancerígenas pueden adquirir una alta capacidad proliferativa mediante diferentes vías. Una posibilidad consiste en la producción de factores de crecimiento mitogénicos por la propia célula tumoral que estimulen de forma autocrina su proliferación (Heldin, 2012). Alternativamente, las interacciones de las células cancerosas con las células normales, que sirven de soporte al tumor, pueden estimular a éstas para que suministren factores de crecimiento a las células cancerosas (Aharinejad et al., 2009). Otro mecanismo consiste en el aumento de los niveles de expresión de proteínas receptoras superficiales en las células cancerosas, haciéndolas más sensibles a los factores de crecimiento, o la aparición de alteraciones estructurales en las moléculas receptoras que provoquen su activación de forma ligando-independiente. Este mantenimiento de la señalización proliferativa también puede ser causado por la expresión constitutiva de los componentes de las vías de señalización que operan corriente abajo, obviando el requerimiento de la unión del ligando a su receptor para iniciar la división celular (Hanahan and Weinberg, 2011).

Dentro del genoma humano, existen un gran número de genes implicados en el proceso de proliferación celular, conocidos como protooncogenes. Estos genes son denominados como oncogenes, y sus productos oncoproteínas, cuando aparecen mutados o expresados incorrectamente, acelerando la progresión a través del ciclo celular y produciendo una proliferación descontrolada de las células (Newsholme and Leech, 2009). Las funciones celulares de estos genes son muy variadas. Así, por ejemplo, algunos protooncogenes son codificantes de receptores de factores de crecimiento, como el PDGFR o los receptores de EGF (EGFR); transductores de señales, como las proteínas RAS (p21); factores de transcripción como las proteínas MYC; co-activadores transcripcionales, como la β -catenina; o receptores transmembrana que a su vez actúan a modo de factores de transcripción, como las proteínas NOTCH (Chung et al., 2010b).

Múltiples mecanismos están implicados en la activación de protooncogenes celulares normales en el cáncer humano. Así, por ejemplo, alteraciones genéticas, entre las que se incluyen mutaciones puntuales, amplificaciones génicas y reorganizaciones estructurales como las translocaciones cromosómicas, pueden resultar en una propiedad funcional alterada o amplificada de la proteína codificada, la

cual será dominante sobre la proteína salvaje. Es por ello que estas mutaciones son comúnmente denominadas como “mutaciones de ganancia de función” (Chung et al., 2010b). También existen miRNA que tienen una función oncogénica o supresora de tumores. Así, por ejemplo, una disminución de la expresión de miRNA que actúan como supresores de tumores puede provocar un incremento en la expresión de sus oncogenes diana (Cho, 2012). Otros cambios epigenéticos que también pueden derivar en la activación de protooncogenes son los debidos a hipometilación o a modificaciones de las histonas, que provocan cambios en la conformación de la cromatina que pueden derivar en una mayor expresión de protooncogenes o una disminución de la expresión de miRNA supresores de tumores (Peltomaki, 2012; Sato et al., 2011).

5.4.2. EVASIÓN DE LOS MECANISMOS SUPRESORES DEL CRECIMIENTO

Además de la capacidad de las células cancerosas de inducir y mantener activadas las señales estimuladoras del crecimiento, estas células también deben eludir los potentes programas que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de la acción de los genes denominados supresores de tumores (Hanahan and Weinberg, 2011). Algunos genes supresores de tumores codifican para proteínas involucradas en la reparación del DNA, como las proteínas de reparación de errores de apareamientos replicativos (del inglés “mismatch repair”, MMR) tales como MSH, MLH y PMS, o las denominadas de cáncer de mama (BRCA) (Chung et al., 2010b). Mutaciones o alteraciones epigenéticas que inactiven estos genes provocan un incremento en las tasas de mutación, favoreciendo la aparición de mutaciones en otros genes supresores de tumores y protooncogenes y, por lo tanto, promoviendo la carcinogénesis (Valeri et al., 2010). Otras proteínas codificadas por genes supresores de tumores son, por ejemplo, i) factores de transcripción, como la proteína tumoral p53 (TP53); ii) reguladoras de factores de transcripción, como la proteína del retinoblastoma (RB); iii) inhibidores de la proliferación por contacto celular, como NF2; iv) o forman parte de rutas de señalización, como integrantes de la ruta TGF- β , muy relacionada con funciones antiproliferativas, los receptores transmembrana Patched (PTCH) de la ruta Hh, o reguladores de la ruta Wnt, como la proteína APC (Chung et al., 2010b).

Dos de los genes supresores de tumores más estudiados son los que codifican para las proteínas RB y TP53. El gen *RB* produce un regulador transcripcional que integra las señales provenientes de diversas fuentes extracelulares e intracelulares y, en respuesta, decide si una célula debe continuar a través de su ciclo de crecimiento y división, principalmente a nivel del tránsito de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Burkhart and Sage, 2008). El factor de transcripción TP53 es conocido como el “guardián del genoma” y se ha observado que el gen *TP53* aparece mutado en más del 50% de cánceres. Esta proteína responde a diferentes señales intracelulares derivadas del estrés celular o el daño en el DNA, deteniendo la progresión del ciclo celular y activando los sistemas de reparación hasta que estas condiciones se han normalizado, e incluso desencadenando la apoptosis cuando el daño es irreparable (Taira and Yoshida, 2012). Tanto RB como TP53 operan como nodos centrales de control dentro de los dos principales circuitos reguladores celulares complementarios que rigen las decisiones de las células para proliferar o, alternativamente, activar los programas de senescencia y apoptosis (Hanahan and Weinberg, 2011).

Los principales mecanismos genéticos que pueden producir la inactivación de genes supresores de tumores son las mutaciones puntuales y las deleciones cromosómicas. Este tipo de mutaciones son denominadas como “mutaciones de pérdida de función”, ya que producen la inactivación de las proteínas codificadas por los genes afectados (Chung et al., 2010b). La hipótesis de Knudson postula que la inactivación de genes supresores de tumores, a diferencia de los protooncogenes, requiere de dos eventos, es decir, que los dos alelos del gen estén afectados. El primero puede ser adquirido somáticamente, “cáncer esporádico”, o a partir de la línea germinal, “cáncer hereditario”, mientras que el segundo siempre es adquirido de forma somática (Knudson, 1971). Esta hipótesis fue posteriormente apoyada por diversos estudios, como la observación de que la fusión de una célula normal con una cancerosa revierte el fenotipo tumoral, determinando el carácter recesivo de este tipo de eventos (Harris, 1988).

Por otro lado, cambios epigenéticos que afecten a genes supresores de tumores, como la hipermetilación, pueden provocar la disminución de su actividad e incluso la completa inhibición de la expresión de la proteína codificada por éste, produciendo el mismo efecto que una mutación genética (Brower, 2011). A su vez, un incremento en la expresión de miRNA oncogénicos puede producir una disminución de

los niveles celulares de proteínas supresoras de tumores codificados por sus mRNA diana (Cho, 2012). Además, cambios en la conformación de la cromatina por modificaciones de las histonas también pueden desencadenar el silenciamiento de genes supresores de tumores e incluso incrementar la expresión de miRNA oncogénicos, induciendo la tumorigénesis (Peltomaki, 2012; Sato et al., 2011).

5.4.3. RESISTENCIA A LA MUERTE CELULAR

La apoptosis es una forma estrictamente regulada de muerte celular que desempeña un papel fundamental en el desarrollo normal y la homeostasis de los tejidos mediante la eliminación de células innecesarias o perjudiciales (Plati et al., 2011). Existen dos vías apoptóticas principales: i) la *ruta extrínseca*, que recibe y procesa señales extracelulares inductoras de la apoptosis, principalmente mediante receptores de la familia TNF como las proteínas con dominio de muerte asociado a FAS (FADD); ii) y la *ruta intrínseca*, que detecta e integra una variedad de señales de origen intracelular, fundamentalmente regulada por la familia de proteínas BCL-2. Ambas vías apoptóticas concluyen en la activación de las denominadas caspasas (CASP), un grupo de proteínas citosina proteasas intracelulares que son los efectores finales que ejecutan la apoptosis (Adams and Cory, 2007; Hanahan and Weinberg, 2011; Plati et al., 2011).

La familia de proteínas BCL-2 incluye miembros tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos (Adams and Cory, 2007). Modificaciones genéticas y epigenéticas de los miembros de la familia BCL-2 que conllevan la inactivación de proteínas pro-apoptóticas o una sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas permiten a las células cancerosas evadir la apoptosis (Plati et al., 2011). Además de las proteínas de la familia BCL-2, otros reguladores implicados en apoptosis son: las proteínas oncogénicas MYC, la proteína supresora de tumores TP53, las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) y las proteínas inhibidoras de FLICE (FLIP) (Cotter, 2009; Plati et al., 2011). La pérdida de función de la proteína TP53 es el mecanismo más común encontrado en las células tumorales para evitar el proceso apoptótico. Esta proteína interactúa con ciertos miembros pro-apoptóticos de la familia BCL-2, induciendo la apoptosis cuando el daño celular es irreparable (Hanahan and Weinberg, 2011). Por otro lado, la evasión de la apoptosis por parte de las células cancerígenas también puede ser debida a: i) alteraciones en la expresión o función de proteínas MYC (Lawlor

et al., 2006), IAP (Fulda and Vucic, 2012) y FLIP (Bagnoli et al., 2010); ii) o modificaciones en receptores implicados en la ruta apoptótica extrínseca, que se ven afectados en algunas células tumorales, permitiendo a estas células escapar a las señales extracelulares inductoras de apoptosis (Tauzin et al., 2012).

Aparte de la apoptosis, existen otros mecanismos de muerte celular entre los que se incluyen la autofagia, la necrosis y la catástrofe mitótica (Jin and El-Deiry, 2005). Respecto a la muerte celular por autofagia, se sabe que este mecanismo también consta de diversos reguladores y efectores, habiéndose observado cierta interconexión con el proceso apoptótico. Defectos en esta ruta están relacionados con el cáncer, por lo que es considerada una ruta supresora de tumores (Levine and Kroemer, 2008). En lo referente a la muerte celular por necrosis, algunos estudios indican que las células inflamatorias del sistema inmune, reclutadas tras producirse un proceso necrótico, pueden inducir el crecimiento tumoral y favorecer la progresión neoplásica (Grivennikov et al., 2010). Por otro lado, la catástrofe mitótica es un mecanismo onco-supresivo desencadenado por una mitosis aberrante que opera en última instancia a través de la senescencia y la muerte celular, pudiendo producirse ésta por apoptosis o necrosis (Galluzzi et al., 2012), y es actualmente investigado como un objetivo terapéutico en cáncer (Pawlik et al., 2012).

5.4.4. INMORTALIDAD REPLICATIVA

La mayoría de linajes celulares normales del cuerpo presentan un número limitado de ciclos de crecimiento y división. Esta limitación se ha asociado con dos barreras distintas que restringen la proliferación: i) la senescencia, que conlleva una entrada, por lo general irreversible, en un estado no proliferativo, pero viable; ii) y la crisis, que implica la muerte celular. En algunas ocasiones, las células en cultivo surgen de una población en crisis y muestran un potencial de replicación ilimitado, gracias a un proceso conocido como immortalización celular, rasgo característico de las líneas celulares establecidas. Respecto a las células cancerosas, está ampliamente aceptado que estas células requieren de un potencial de replicación ilimitado a fin de ser capaces de generar tumores macroscópicos (Hanahan and Weinberg, 2011).

La capacidad de proliferación celular está mediada por los telómeros, que son elementos cromosómicos esenciales para garantizar una adecuada replicación y protección de los extremos del DNA. Las células en cultivo sufren un acortamiento progresivo de los telómeros, dando lugar a una detención irreversible del crecimiento, un fenómeno conocido como senescencia celular, e incluso a la entrada en una etapa de crisis que conlleva la muerte celular. Por lo tanto, los telómeros actúan como un "reloj" que determina el tiempo de vida a nivel celular. Más del 80% de los tumores presentan una reactivación de los mecanismos para mantener sus telómeros, mediante la sobre-expresión de una enzima denominada telomerasa. En las células telomerasa-positivas, los telómeros se mantienen a una longitud estable lo que resulta en la inmortalización celular (Diotti and Loayza, 2011). Además, recientemente han sido descubiertas otras funciones extra-teloméricas de esta enzima que también pueden contribuir al proceso carcinogénico, entre las que se encuentran: la de actuar como modulador transcripcional de la ruta WNT/ β -catenina, mostrar una función RNA polimerasa dependiente de RNA (Martinez and Blasco, 2011), e incluso aumentar la proliferación (Gorbunova and Seluanov, 2003) e inhibir la apoptosis (Soares et al., 2011).

5.4.5. INDUCCIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren alimento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuación de desechos metabólicos y el CO₂. La neovasculatura asociada al tumor, generada por el proceso angiogénico, está dirigida a suplir estas necesidades (Hanahan and Weinberg, 2011). Sin embargo, los vasos tumorales son desorganizados y heterogéneos, mostrando ciertas diferencias estructurales y funcionales con los de la vasculatura normal (Nagy and Dvorak, 2012).

El principal activador de la angiogénesis en los tumores es el VEGF, aunque se ha visto que otras señales pro-angiogénicas, como la inducida por miembros de la familia del FGF o los ligandos transmembrana DLL4 de receptores NOTCH, también están implicadas en el mantenimiento de la angiogénesis tumoral (Ferrara, 2010). Estos factores pro-angiogénicos pueden ser sobre-expresados en el tejido neoplásico por oncogenes dominantes que operan dentro de las propias células tumorales, como RAS y MYC, o pueden ser expresados a través de señales inductivas que se producen

indirectamente por las células inflamatorias inmunes (Hanahan and Weinberg, 2011). En este aspecto están principalmente implicadas diversas células mieloides, aunque otras células del estroma, como los fibroblastos asociados al tumor o al cáncer (TAF o CAF), también sobre-expresan diversos factores angiogénicos que favorecen la neovascularización tumoral (Ferrara, 2010).

En la formación de los vasos circulatorios que irrigan al tumor están implicados diferentes mecanismos (ver apartado 3.2.3., Figura 7) y diferentes tipos celulares, aparte de las propias células cancerígenas, como las EC de los vasos preexistentes y las EPC (Carmeliet and Jain, 2011). En este proceso también tienen un papel importante las MSC, que son reclutadas al tejido tumoral gracias a la producción de VEGF, participando en la formación de los vasos (Comsa et al., 2012); y los pericitos, que estabilizan los canales de EC durante la formación de los vasos sanguíneos (Hellberg et al., 2010). Respecto a estos últimos, se ha observado que los pericitos que expresan PDGFR- β tienen un doble papel en la metástasis. En los tumores primarios, los pericitos limitan la intravasación de las células tumorales, correlacionándose la ausencia de pericitos alrededor de los vasos con metástasis. Sin embargo, otros informes han demostrado que los pericitos, coaptados por las células tumorales en los sitios de micrometástasis, permiten la colonización del tumor mediante la liberación de factores angiogénicos (Carmeliet and Jain, 2011).

5.4.6. ACTIVACIÓN DE SU CAPACIDAD DE INVASIÓN Y METÁSTASIS

A medida que las neoplasias avanzan en su grado patológico y de malignidad, las células cancerosas adquieren la capacidad de difundir desde el tumor primario a otros órganos, lo que se refleja en la invasión local y la metástasis a distancia (Hanahan and Weinberg, 2011). Este proceso puede ser subdividido en varios pasos, que son conocidos en conjunto como la cascada de invasión-metástasis: i) la vascularización y el crecimiento progresivo del tumor primario, ii) la invasión local a través de la ECM y las capas de células del estroma circundantes; iii) la intravasación de células cancerosas al lumen de los vasos linfáticos y sanguíneos, iv) la supervivencia al transporte, v) la detención de estas células en órganos distantes, vi) la extravasación al parénquima de estos tejidos, vii) la formación de micrometástasis, viii) y el crecimiento de estos nódulos de células cancerosas para originar tumores

macroscópicos, proceso que es denominado como “colonización metastásica” (Figura 13) (Talmadge and Fidler, 2010; Valastyan and Weinberg, 2011).

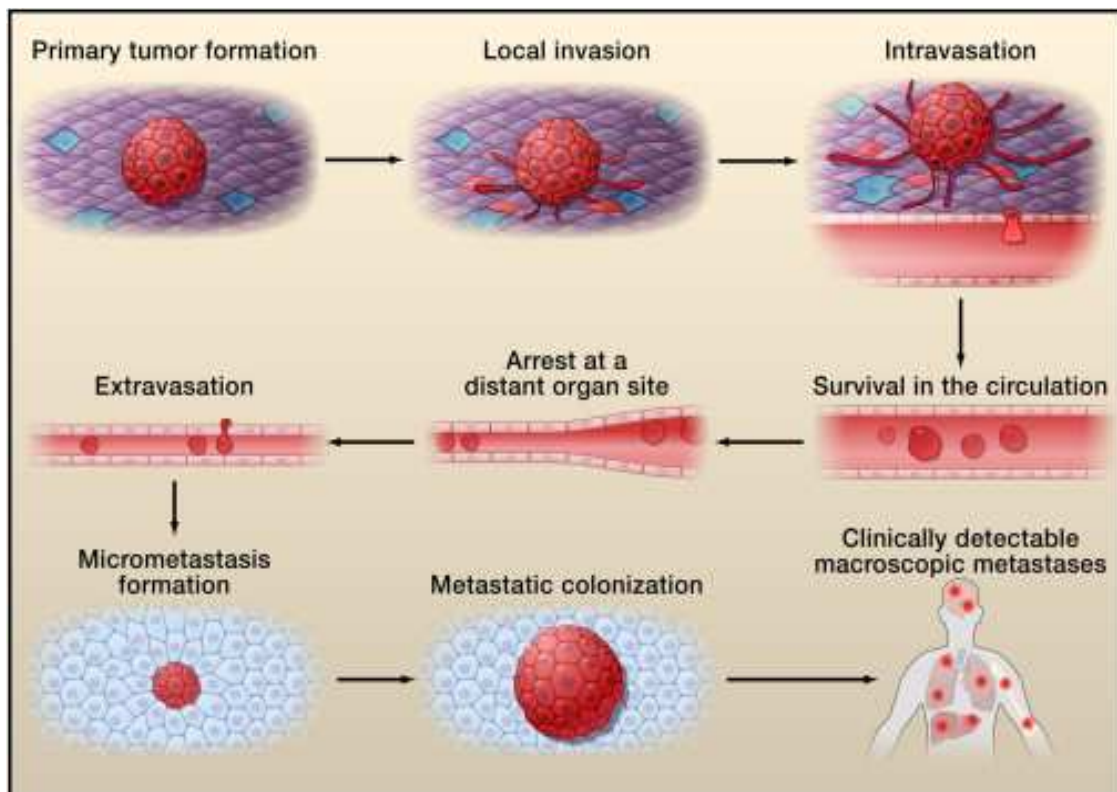


Figura 13. Representación esquemática de la cascada de invasión-metástasis
(Imagen tomada de Valastyan and Weinberg, 2011)

Los primeros pasos de este proceso implican el desprendimiento de las células cancerosas, su migración e invasión. Este primer estadio está principalmente mediado por la activación de MMP, que rompen la ECM (Kessenbrock et al., 2010); y el programa EMT, que altera la morfología de las células cancerosas y su capacidad de adhesión a otras células y a la ECM (Micalizzi et al., 2010). Ambos mecanismos, además de otros, también están implicados en la intravasación de estas células (Le et al., 2010), aunque este proceso está muy influenciado por las características estructurales de los vasos sanguíneos asociados al tumor (Valastyan and Weinberg, 2011). Por otro lado, existen múltiples evidencias de que las interacciones entre las células cancerosas y las células del estroma neoplásico están implicadas en la adquisición de la capacidad del crecimiento invasivo y la metástasis (Egeblad et al., 2010; Joyce and Pollard, 2009). Así, por ejemplo, se ha demostrado que la secreción

de citoquinas, como CCL5 o IL-6, a partir de MSC y adipocitos presentes en el estroma tumoral, actúan de forma paracrina sobre las células del cáncer, incrementando su movilidad y su capacidad de invasión y metástasis (Dirat et al., 2011; Karnoub et al., 2007).

Una vez las células cancerosas alcanzan la circulación, desarrollan diversos mecanismos que les permiten sobrevivir al estrés que supone la separación de la ECM, así como a las fuerzas de cizallamiento hemodinámicas y a las células del sistema inmune. Estas células tumorales circulantes viajan hasta detenerse en órganos distales, habiéndose observado que las metástasis de ciertos cánceres primarios muestran preferencia hacia un órgano específico. Aún no se conoce si este tropismo tisular simplemente refleja un proceso pasivo, por el cual estas células quedan retenidas en los lechos capilares debido a la disposición de la vasculatura y al tamaño de los vasos sanguíneos o, en cambio, se debe a procesos activos mediados por interacciones ligando-receptor entre estas células y las paredes lumbales de la microvasculatura (Valastyan and Weinberg, 2011).

Cuando las células tumorales circulantes se adhieren a los lechos capilares, atraviesan la pared del vaso por un proceso denominado extravasación, introduciéndose en el parénquima del órgano diana y originando las micrometástasis (Talmadge and Fidler, 2010). Respecto a la colonización metastática, se ha observado que la angiogénesis juega un papel crucial en el crecimiento de las micrometástasis. En este proceso están implicadas las EPC, las cuales se dirigen hacia estos tejidos y colonizan las micrometástasis, acelerando el proceso angiogénico y facilitando el crecimiento de éstas para dar lugar a las metástasis macroscópicas (Gao et al., 2008).

5.4.7. OTRAS CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS

La adquisición de las características enumeradas anteriormente, que permiten a las células cancerígenas sobrevivir, proliferar y diseminarse, depende en gran parte de una sucesión de alteraciones en los genomas de estas células. Se ha observado que las células cancerígenas muestran un incremento en las tasas de mutación respecto al resto de células del organismo. Esta inestabilidad genómica es principalmente debida: i) a la aparición de defectos en la maquinaria de mantenimiento y reparación del DNA, incluyendo proteínas involucradas en la detección de daños en

el DNA y en la activación de la maquinaria de reparación, proteínas que participan directamente en la reparación del DNA, y las implicadas en la inactivación de moléculas mutagénicas antes de que dañen el DNA; ii) y a una disfunción telomérica, causada por la pérdida de repeticiones teloméricas o de las estructuras de protección de los telómeros (Hanahan and Weinberg, 2011; Martinez and Blasco, 2011; Negrini et al., 2010).

Por otro lado, los tumores aparecen infiltrados por células del sistema inmune y, por lo tanto, reflejan las condiciones inflamatorias que surgen en los tejidos no neoplásicos. Estos procesos inflamatorios asociados a los tumores también participan en la adquisición, por parte de las neoplasias incipientes, de las características distintivas de las células cancerígenas. La inflamación ocasionada por los tumores contribuye a la carcinogénesis principalmente mediante el suministro de moléculas bioactivas en el microambiente del tumor, incluyendo factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores pro-angiogénicos y enzimas que modifican la ECM y facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis, y señales inductivas que activan el programa EMT, entre otras (Colotta et al., 2009; Grivennikov et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011).

Además, las células cancerosas presentan otros atributos que son funcionalmente importantes para el desarrollo del cáncer. Así pues, estas células muestran una importante reprogramación del metabolismo energético celular que permite su continuo crecimiento y proliferación celular, sustituyendo el programa metabólico que funciona en la mayoría de los tejidos normales y utilizando nutrientes diferentes a los que emplean las demás células del organismo en condiciones fisiológicas (Hanahan and Weinberg, 2011; Vander Heiden, 2011). Por otro lado, las células cancerígenas emplean diferentes mecanismos para evadir el ataque y su eliminación por las células del sistema inmune. Estas células muestran una baja inmunidad, aunque algunas son reconocidas y eliminadas por las células inmunes. Este hecho pone de manifiesto el doble papel que el sistema inmunológico juega en la tumorigénesis ya que, por un lado, participa en el desarrollo y progresión tumoral y, por otro lado, cumple una función protectora activa en la eliminación de las células cancerígenas (Hanahan and Weinberg, 2011; Murphy, 2010).

5.5. TEORÍAS SOBRE LA HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL

5.5.1. MODELO ESTOCÁSTICO

El modelo estocástico, o modelo de evolución clonal, propone que los tumores son monoclonales, es decir, proceden de una única célula anormal, y que, con el tiempo, los descendientes de esta célula ancestral adquieren varias combinaciones de mutaciones, produciéndose una selección clonal por la adquisición de ciertas ventajas respecto a las células vecinas. Esta variabilidad genética sería responsable tanto de la progresión del tumor, como de la existencia de diferencias celulares dentro de éste, es decir, la heterogeneidad intratumoral (Durrett et al., 2011; Nowell, 1976).

Este modelo sostiene que todas las células dentro de un tumor son biológicamente equivalentes y, por lo tanto, tienen igual capacidad de regenerar el tumor. La heterogeneidad morfológica, proliferativa y funcional que se observa entre las células de un mismo tumor son debidas a influencias aleatorias o estocásticas que alteran el comportamiento de las células individuales del tumor. Estos eventos estocásticos pueden ser: i) intrínsecos, como las variaciones en los niveles de factores de transcripción o la desregulación de las vías de señalización; ii) o extrínsecos, como un microambiente apropiado o la respuesta inmune. Así pues, este modelo establece que todas las células del tumor poseen el mismo potencial para impulsar el crecimiento tumoral, aunque sólo una pequeña población desarrolla esta funcionalidad. Lo que determina que una célula adquiriera la capacidad de iniciar un tumor es debida a que concurren las influencias adecuadas, lo que hace imposible aislar prospectivamente la fracción iniciadora del tumor (Figura 14A) (Dick, 2009; O'Brien et al., 2009).

5.5.2. MODELO DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

El modelo de las células madre cancerígenas (CSC), o modelo jerárquico, postula que los tumores se desarrollan a partir de un subconjunto de células malignas que poseen características de SC, que son las únicas células capaces de iniciar y mantener el crecimiento del tumor (Figura 14B). Estas CSC, también conocidas habitualmente como células iniciadoras de tumores (TIC), se definen por propiedades

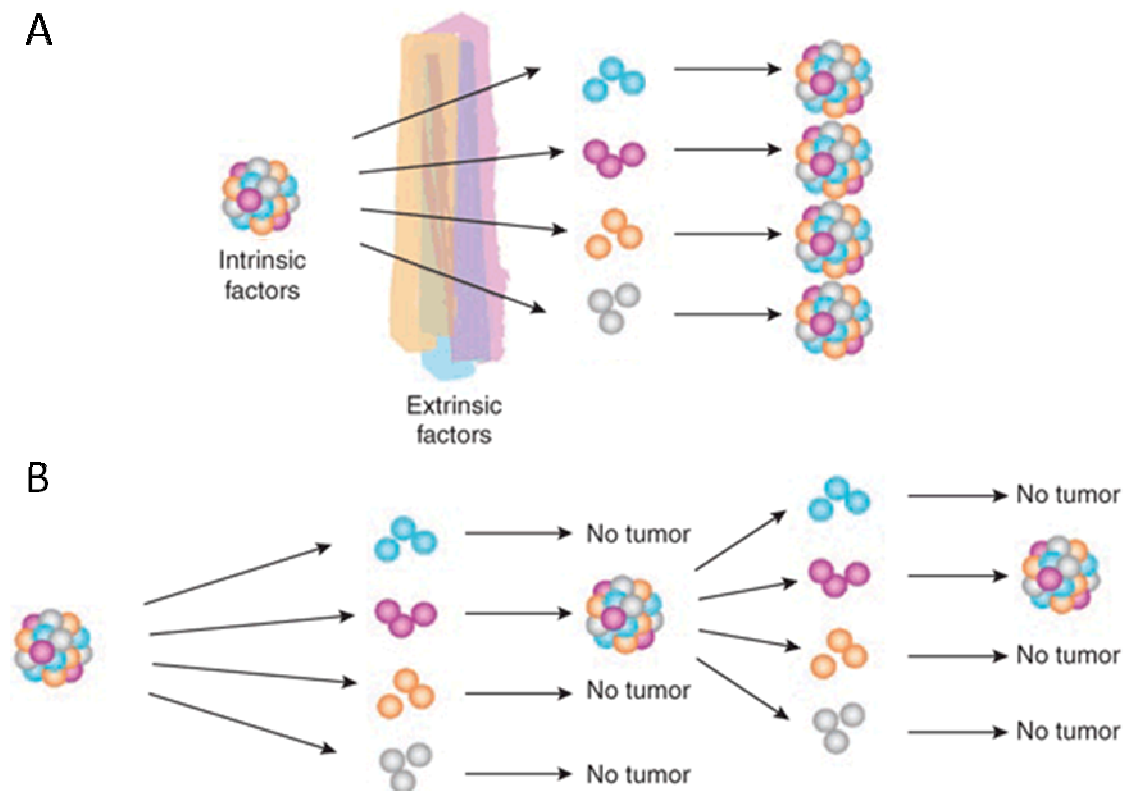


Figura 14. Teorías sobre la heterogeneidad intratumoral: (A) Modelo estocástico; (B) Modelo de las células madre cancerígenas (CSC) (Imagen modificada de Dick, 2009)

como: i) su capacidad para iniciar tumores y dirigir la proliferación neoplásica; ii) su capacidad de auto-renovación infinita; iii) su capacidad de dividirse asimétricamente, dando lugar a una descendencia más madura de células progenitoras en rápida expansión, que con el tiempo se diferencian y agotan su potencial proliferativo, pudiendo potencialmente originar cualquier célula del tumor; iv) su resistencia a la apoptosis; v) o su potencial metastásico. Así pues, de acuerdo con este modelo, esta población de CSC muestra ciertas diferencias con el resto de células del tumor, por lo que debería ser posible aislarlas prospectivamente (O'Brien et al., 2009; Talmadge and Fidler, 2010).

Los primeros en relacionar la formación tumoral con las SC fueron Rudolf Virchow y Julius Cohnheim en el siglo XIX. En el año 1855, Virchow propuso la “hipótesis del resto embrionario”, basándose en las similitudes histológicas entre los tumores y los tejidos embrionarios, que proponía que el cáncer surgía de la activación de restos embrionarios “latentes” presentes en el tejido maduro (Virchow, 1855).

Posteriormente, Cohnheim postuló la “teoría embrionaria” del origen de los tumores, por la cual, los restos de células embrionarias que formaban los tumores procedían de restos embrionarios "perdidos" durante la organogénesis, apoyando la idea inicial propuesta por Virchow (Cohnheim, 1867). Sin embargo, los primeros avances en la investigación de las CSC no se produjeron hasta la segunda mitad del siglo XX (Huntly and Gilliland, 2005).

Uno de los primeros experimentos que corroboraron la existencia de CSC fue el realizado por Chester M. Southam y Alexander Brunschwig en 1961. En sus estudios observaron que sólo un porcentaje muy reducido de células tumorales, que habían sido extraídas de pacientes con neoplasia diseminada y, posteriormente, inyectadas por vía subcutánea en otras partes del cuerpo de los mismos pacientes, tenían la capacidad de formar tumores (Southam and Brunschwig, 1961). Las investigaciones para la búsqueda de esta subpoblación celular se sucedieron en años posteriores, y fueron por primera vez identificadas en la leucemia en 1994 (Lapidot et al., 1994), proponiéndose la posibilidad de que los tumores sólidos también eran conducidos por CSC (Reya et al., 2001). Casi una década después, fueron descritas estas poblaciones celulares en tumores sólidos, concretamente en cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003), y posteriormente han sido identificadas en otros tipos de cáncer. Sin embargo, actualmente no se ha demostrado que todos los cánceres puedan ser explicados por este modelo, e incluso se piensa que el origen de estas CSC puede seguir un modelo de evolución clonal (Shackleton et al., 2009).

5.6. TEORÍAS SOBRE LA HETEROGENEIDAD INTERTUMORAL

5.6.1. MODELO MUTACIONAL

El modelo mutacional postula que la variabilidad observada entre los tumores que surgen en un mismo órgano son debidas a mutaciones genéticas y/o epigénéticas, las cuales determinan el fenotipo del tumor, de tal manera que las diferencias en la morfología y características de éstos son resultado de mutaciones diferentes (Figura 15A). Esta heterogeneidad intertumoral conduce a la clasificación de los diferentes subtipos de tumores que se localizan en un mismo órgano, los cuales se caracterizan por su perfil molecular, su morfología y la expresión de marcadores específicos, tales como receptores de factores de crecimiento y hormonales (Visvader, 2011).

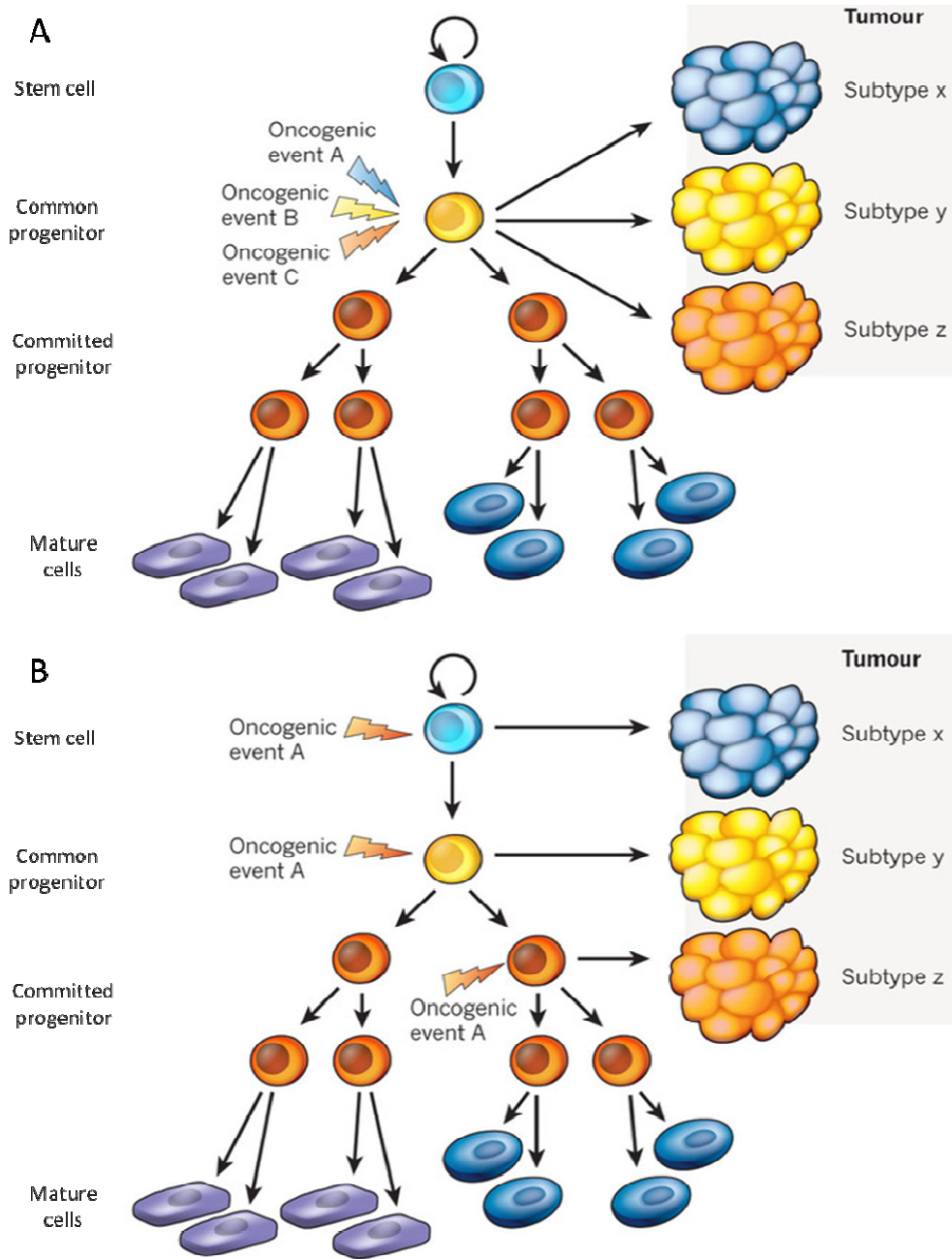


Figura 15. Teorías sobre la heterogeneidad intertumoral: (A) Modelo mutacional; (B) Modelo de la célula de origen (Imagen modificada de Visvader, 2011)

5.6.2. MODELO DE LA CÉLULA DE ORIGEN

El modelo de la célula de origen determina que los diferentes subtipos de cáncer que surgen dentro de un mismo órgano o tejido son debidos a diferentes poblaciones celulares en la jerarquía del linaje celular (Figura 15B). Según este

modelo, cada célula normal del organismo, ya sea SC, progenitora o diferenciada, puede acumular mutaciones y convertirse en la célula de origen. Dependiendo del grado de diferenciación de la célula que adquiera inicialmente el fenotipo tumoral, se desarrollará un subtipo tumoral u otro (Figura 15B) (Visvader, 2011).

El concepto de la célula de origen hace referencia a la célula que adquiere mutaciones tumorigénicas y se convierte en la primera célula tumoral, y difiere de las células responsables de la propagación del tumor después de su creación. Después de esta transformación maligna, la progresión de la carcinogénesis puede seguir un modelo estocástico o un modelo de CSC, independientemente del grado de diferenciación de la célula de origen (Vaiopoulos et al., 2012). En el caso de que el tumor siga un modelo de CSC, la génesis de éstas puede requerir posteriores modificaciones en las células descendientes de la célula de origen, aún cuando ésta sea una SC (Figura 16). Así pues, aunque los términos TIC y CSC suelen ser utilizados indistintamente, el primero denota más adecuadamente la célula de origen, mientras que el segundo hace referencia a las células que propagan el cáncer (Visvader, 2011).

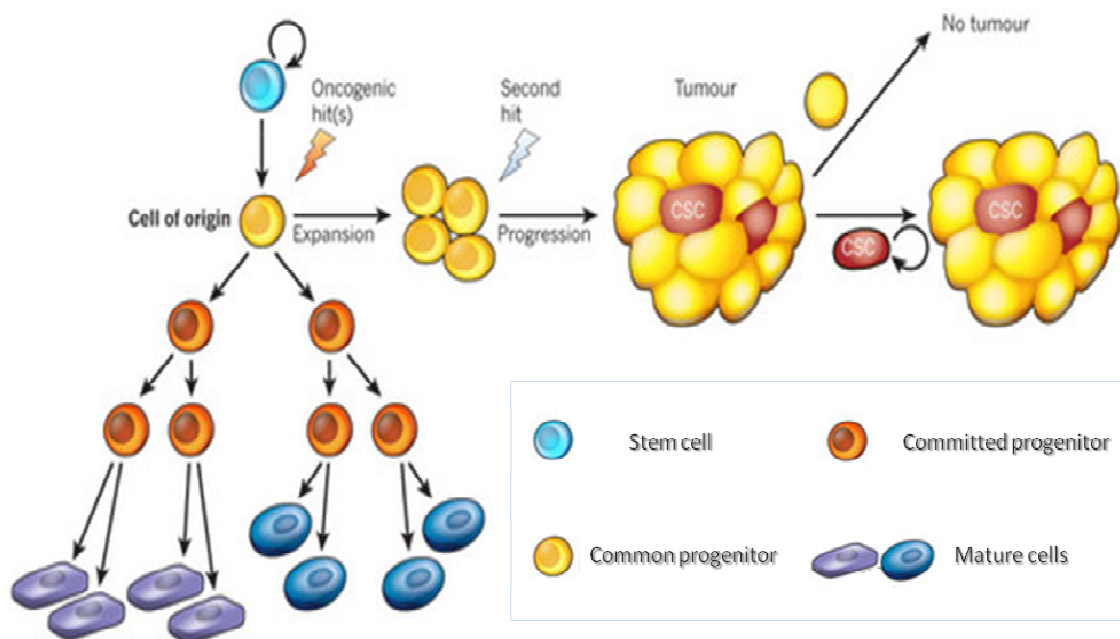


Figura 16. Posible relación entre la célula de origen y las células madre cancerígenas (CSC) (Imagen modificada de Visvader, 2011)

6. TIPOS DE CÁNCER

6.1. CLASIFICACIÓN GENERAL

Existen múltiples clasificaciones de los tumores, no obstante una manera simplificada de clasificarlos, ampliamente utilizada, es la aplicación de una nomenclatura en función de su localización. Así, se habla usualmente de cáncer de colon, mama, cerebral, pulmón, próstata, ovario, laringe, hígado, etc. Sin embargo, cada uno de estos tipos tumorales engloban a un conjunto de subtipos que se diferencian en su perfil molecular, su morfología o la expresión de marcadores específicos, algo conocido como heterogeneidad intertumoral (Visvader, 2011).

Según el tejido a partir del cual se origina el cáncer, se distinguen tres tipos principales: i) *carcinomas*, los cuales representan tumores sólidos que se originan a partir de células epiteliales que recubren las superficies internas y externas del cuerpo; ii) *sarcomas*, tumores sólidos que se desarrollan a partir de células del tejido conectivo, como músculos o huesos; iii) y *linfomas y leucemias*, que son cánceres de las células de la serie blanca de la sangre. Los carcinomas son los más frecuentes, llegando a representar aproximadamente el 85% de todos los tipos de cáncer. Un tipo especial de cáncer del tejido epitelial es el adenocarcinoma, un tumor maligno que deriva de células epiteliales glandulares. En relación a los sarcomas, éstos reciben una nomenclatura diferente según el tejido conectivo al que afecte. Por ejemplo, el condrosarcoma es aquel que se desarrolla en el tejido cartilaginoso, mientras que el osteosarcoma se origina a partir del tejido óseo. Respecto a los cánceres que afectan a las células sanguíneas, se habla de leucemias cuando tienen su origen en las células formadoras de la sangre que residen en la médula ósea, y de linfomas cuando afectan a los nódulos linfáticos. Además de éstos, en función del tejido de origen también se pueden distinguir otros tipos de cáncer, como los blastomas, que se derivan de tejidos embrionarios de los órganos, o los mielomas, que se desarrollan a partir del tejido medular de los huesos (Pardee et al., 2009).

En el ámbito clínico, el grado tumoral y el estadio o etapa del tumor son factores importantes adicionales que influyen en la elección del tratamiento, y permiten una predicción del pronóstico. El grado del tumor hace referencia a la semejanza o no

que tienen las células tumorales con las células normales del mismo tipo de tejido. Para determinar el grado del tumor se combinan parámetros histológicos, en particular el grado de displasia, y nucleares, como el tamaño, forma del núcleo y número de células que se encuentran en división, siendo estos parámetros indicadores de la agresividad de un tumor. El grado tumoral se establece numéricamente, por ejemplo, de grado 1-4, o descriptivamente, alto o bajo grado. Cuanto mayor sea la calificación numérica, menos diferenciadas son las células tumorales y mayor la agresividad del tumor; mientras que, un cáncer de bajo grado suele presentarse bien diferenciado. Por otro lado, el estadio o etapa de un tumor se refiere a la extensión o gravedad del cáncer (Boyle and Levin, 2008). El sistema de clasificación TNM, desarrollado y mantenido por la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) es la herramienta más utilizada para clasificar el grado de diseminación del cáncer. Esta clasificación se basa en la medida del tumor primario (T), la ausencia o presencia de metástasis regionales a ganglios linfáticos (N), y la ausencia o presencia de metástasis distal (M) (Sobin et al., 2010).

Sin embargo, en muchos casos el estudio clásico de la histiología, el grado y el estadio del tumor, no ofrece suficiente información para la selección de una terapia óptima. Así, por ejemplo, muchos carcinomas que presentan el mismo estadio, grado e histología toman cursos clínicos divergentes. En este sentido, una estrategia que se sigue actualmente para la elección en cada caso del tratamiento más adecuado, es la clasificación de estos tumores en función de la expresión de determinados marcadores moleculares (Sarkar, 2009).

6.2. CÁNCER DE MAMA

6.2.1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD

El cáncer de mama es, con diferencia, el cáncer más frecuente entre las mujeres con un número estimado, en el año 2008, de 1,38 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados a nivel mundial. Representa el 23% de todos los cánceres que se desarrollan en mujeres (Figura 11B), y ocupa el segundo lugar global, con un 10,9% para el conjunto de la población. Aunque es el cáncer más común en mujeres tanto en regiones desarrolladas como en desarrollo, las tasas de incidencia son muy superiores en las primeras. El riesgo de padecer este tipo de cáncer aparece

principalmente a partir de los 40 años, y va aumentando a medida que avanza la edad, pasando de una tasa de incidencia del $63,3/10^5$ en el rango de edad comprendido entre 40-44 años, al $162,5/10^5$ en las mujeres mayores de 75 años. En nuestro país, la incidencia del cáncer de mama entre las mujeres se estima en un 28,5% respecto al total de cánceres registrados (Ferlay et al., 2008).

El rango de la tasa de mortalidad es mucho menor, aproximadamente de $19,6/10^5$ para la población mundial (Figura 11B), a causa de la mayor supervivencia en las regiones desarrolladas (Ferlay et al., 2008). Esta disminución de la mortalidad por cáncer de mama en los países desarrollados en las últimas dos décadas es debida, principalmente, a la mejora de las técnicas de diagnóstico, como las mamografías, y de los tratamientos aplicados (Boyle and Levin, 2008). Como resultado, el cáncer de mama se sitúa como la quinta causa de muerte por cáncer a nivel global, representando una tasa de mortalidad del 6,1% del total, pero sigue siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer en las mujeres, con un 13,7%. En España, al igual que en el resto de países, es la principal causa de defunción por neoplasias entre las mujeres. Se estima que algo más de 6.000 mujeres murieron a causa de cáncer de mama en el año 2008, lo que representa una tasa de mortalidad del 15,6% del conjunto de muertes debidas a cáncer (Ferlay et al., 2008).

6.2.2. ETIOLOGÍA

Los principales agentes externos implicados en el desarrollo de cáncer de mama en el ser humano lo constituyen las bebidas alcohólicas, fármacos como el dietilestilbestrol, los anticonceptivos y las terapias menopáusicas que combinan estrógeno y progesterona, así como las radiaciones X y gamma. Todos estos factores están catalogados dentro del grupo 1 según la clasificación de carcinógenos de la IARC (Cogliano et al., 2011; IARC, 2012). Además del consumo de bebidas alcohólicas, otros factores relacionados con el estilo de vida también influyen en el desarrollo de cáncer de mama. En este sentido, diferentes estudios demuestran que una dieta poco saludable y la obesidad aumentan el riesgo de padecer este tipo de cáncer (Khan et al., 2010). Por otro lado, la actividad física reduce la incidencia del cáncer de mama, así como de otros, y también contrarresta algunos de los efectos adversos de los tratamientos contra el cáncer. Además, atenúa la progresión de la enfermedad y reduce el riesgo de recurrencia (Davies et al., 2011).

Respecto a la influencia de la dieta en el riesgo de padecer este tipo de cáncer, se ha observado que la ingesta de cantidades elevadas de grasas saturadas lo incrementa, mientras que el consumo de ácidos grasos insaturados como ω -3 y eicosapentaenoico se asocian con un riesgo significativamente menor (Khan et al., 2010). También existen algunas evidencias de que el consumo de soja puede reducir el riesgo de padecer este tipo de cáncer (Dong and Qin, 2011).

Por otro lado, la obesidad o un índice de masa corporal elevado se asocia con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama y de que éste sea más agresivo (Carmichael, 2006; Majed et al., 2008). El cáncer de mama en individuos obesos presenta ciertas características, como un aumento de la inflamación, la hipoxia, la angiogénesis, y cambios en los reguladores de crecimiento como la adiponectina, la leptina y los estrógenos (Fontana et al., 2007; Vona-Davis and Rose, 2009). Los adipocitos del tejido obeso producen un incremento de quimiocinas y leptinas que, a su vez, atraen a macrófagos inflamatorios que producen proteínas pro-inflamatorias y factores pro-angiogénicos que proporcionan un microambiente favorable para el crecimiento del tumor (Campbell et al., 2011; Zeyda et al., 2010). Puesto que la activación paracrina de rutas de señalización mediada por citoquinas puede promover la proliferación oncogénica (Bromberg and Wang, 2009; Cabodi and Taverna, 2010), el entorno rico en citoquinas derivadas del tejido adiposo de la mama puede contribuir a la tumorigénesis mamaria y/o a su progresión.

Además, este tipo de cáncer también se ha relacionado con diversos factores reproductivos y hormonales. Una edad de menarquía temprana, una edad avanzada en el primer parto y una edad de menopausia tardía han sido asociadas con el riesgo de cáncer de mama, así como de cáncer de endometrio y ovario; mientras que un aumento de la paridad disminuye el riesgo de padecer este tipo de cánceres (Parsa and Parsa, 2009; Pike et al., 2004). Por otro lado, la exposición prolongada a altos niveles de esteroides sexuales endógenos, como los estrógenos, aumenta el riesgo de cáncer de mama en mujeres post-menopáusicas. Respecto al uso de anticonceptivos orales, éstos se asocian con un modesto aumento en el riesgo de cáncer de mama, que sin embargo desaparece pocos años después de dejar de usarlos. Por otra parte, la terapia sustitutiva hormonal en la menopausia, principalmente la terapia combinada de estrógeno y progesterona, se asocia con un alto incremento del riesgo de cáncer de mama (Boyle and Levin, 2008; Coglianò et al., 2011; IARC, 2012).

Otro factor de riesgo importante, es el debido a la predisposición genética. Así, por ejemplo, ciertos alelos de genes como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* o *PTEN*, confieren un alto riesgo de cáncer de mama, mientras que determinadas variaciones genéticas que afectan a genes como *PALB2*, *BRIP*, *ATM* o *CHEK2*, se relacionan con un riesgo moderado (Fanale et al., 2012). Además de éstos, recientemente han sido identificados muchos otros genes en los que determinados polimorfismos implican un aumento del riesgo de padecer cáncer de mama, entre los que se encuentran *TNRC9*, *FGFR2*, *MAP3K1*, *TGFB1*, *CASP8*, *H19* o *LSP1*, por ejemplo (Dong et al., 2008; Fanale et al., 2012). De todos ellos, los más conocidos son los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2*. Según algunos estudios, mutaciones heredadas en la línea germinal en mujeres en el gen *BRCA1* se asocian con un riesgo de entre el 60-70% de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida, mientras que mutaciones en el gen *BRCA2* se asocian con un riesgo de entre el 40-60% en mujeres y del 5-10% en hombres. Actualmente se desarrollan terapias específicas para el tratamiento de aquellos cánceres de mama en los que están implicadas mutaciones en estos dos genes (Maxwell and Domchek, 2012).

6.2.3. SUBTIPOS

La WHO clasifica los diferentes tumores que afectan a la mama, desde el punto de vista histológico, en ocho grupos principales: i) tumores epiteliales, ii) lesiones mioepiteliales, iii) lesiones mesenquimales, iv) tumores fibroepiteliales, v) tumores del pezón, vi) linfomas malignos, vii) tumores metastáticos, viii) y tumores de la mama masculina. Además, también son clasificados en función del grado y del estadio, clasificación TNM, en diferentes categorías. En relación a la clasificación histológica, son principalmente importantes los denominados carcinomas invasivos de mama, un grupo de tumores epiteliales malignos caracterizados por la invasión de tejidos adyacentes y una marcada tendencia a metastatizar a sitios distales. Dentro de este grupo se incluyen 20 subtipos diferentes (Tabla 4). La gran mayoría de estos tumores son adenocarcinomas, y se cree que son derivados del epitelio parenquimal mamario, particularmente de células de la unidad ductolobulillar terminal. Respecto a los hombres, existen dos subtipos de tumores mamarios: las ginecomastias y los carcinomas, que a su vez se dividen en *in situ* o invasivos (Tavassoli et al., 2003).

Tabla 4. Clasificación histológica de los carcinomas invasivos de mama
(adaptado de Tavassoli et al., 2003)

Invasive ductal carcinoma, not otherwise specified	Invasive micropapillary carcinoma
Mixed type carcinoma	Apocrine carcinoma
Pleomorphic carcinoma	Metaplastic carcinomas
Carcinoma with osteoclastic giant cells	Pure epithelial metaplastic carcinomas
Carcinoma with choriocarcinomatous features	Squamous cell carcinoma
Carcinoma with melanotic features	Adenocarcinoma with spindle cell metaplasia
Invasive lobular carcinoma	Adenosquamous carcinoma
Tubular carcinoma	Mucoepidermoid carcinoma
Invasive cribriform carcinoma	Mixed epithelial/mesenchymal metaplastic carcinomas
Medullary carcinoma	Lipid-rich carcinoma
Mucinous carcinoma and other tumours with abundant mucin	Secretory carcinoma
Mucinous carcinoma	Oncocytic carcinoma
Cystadenocarcinoma and columnar cell mucinous carcinoma	Adenoid cystic carcinoma
Signet ring cell carcinoma	Acinic cell carcinoma
Neuroendocrine tumours	Glycogen-rich clear cell carcinoma
Solid neuroendocrine carcinoma	Sebaceous carcinoma
Atypical carcinoid tumour	Inflammatory carcinoma
Small cell / oat cell carcinoma	Bilateral breast carcinoma
Large cell neuroendocrine carcinoma	
Invasive papillary carcinoma	

Otra clasificación de este tipo de cánceres, de gran relevancia clínica, está basada en el estudio molecular de los tumores. Esta clasificación molecular aporta una información muy valiosa a la hora de elegir la terapia más adecuada en cada caso, además de servir como valor pronóstico de la enfermedad. Los marcadores moleculares tradicionalmente empleados son los receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR), y el receptor del EGF de tipo 2 (HER2), también conocido como ERBB2 (Prat and Perou, 2011; Sarkar, 2009). Según esta clasificación, se distinguen

cuatro subtipos moleculares intrínsecos principales de cáncer de mama, que se denominan como: i) luminal A, ii) luminal B, iii) HER2, iv) y de tipo basal (Haibe-Kains et al., 2012; Melchor and Benitez, 2008; Wiechmann et al., 2009); además de un grupo denominado como cáncer de mama de tipo normal, que incluye diferentes subtipos (Prat and Perou, 2011).

Los subtipos luminal A y luminal B se caracterizan por expresar marcadores de células lumbinales (Melchor and Benitez, 2008). Los tumores del subtipo luminal A expresan ER y/o PR, pero no sobre-expresan HER2 (ER y/o PR⁺/HER2⁻), mientras que los del subtipo luminal B sí sobre-expresan HER2 (ER y/o PR⁺/HER2⁺). El subtipo HER2 se caracteriza por no expresar receptores hormonales, por lo que su crecimiento es independiente de ambas hormonas, y por una sobre-expresión del protooncogen HER2 (ER⁻/PR⁻/HER2⁺). Por otro lado, el cáncer denominado de tipo basal, se caracteriza por ser ER⁻/PR⁻/HER2⁻, siendo denominado también como triple negativo (Wiechmann et al., 2009).

Respecto a la importancia clínica de la expresión de estos marcadores moleculares, se ha visto que pacientes con cánceres de mama ER⁺/PR⁺ muestran, por regla general, un mejor pronóstico. Sin embargo, los cánceres de mama HER2⁺ son más propensos a metastatizar. Por otro lado, cánceres ER⁺/PR⁺ suelen responder bien a la terapia con anti-estrógenos, al contrario que los ER⁻ o HER2⁺, mientras que los cánceres HER2⁺ pueden ser tratados más satisfactoriamente con una combinación de quimioterapia, como antraciclinas, y un anticuerpo específico frente a HER2, como el trastuzumab (Sarkar, 2009). De todos los subtipos identificados, el de tipo basal es el cáncer de mama más indiferenciado y de peor pronóstico para el paciente. Este subtipo es el más frecuente en las mujeres que presentan mutaciones en el gen *BRCA1* en la línea germinal, y se ha demostrado recientemente que este gen actúa como un regulador de las SC mamarias (MaSC) y está implicado en la diferenciación luminal. Por lo tanto, su ausencia podría generar las características indiferenciadas que caracterizan el fenotipo de tipo basal (Lim et al., 2009; Melchor and Benitez, 2008; Prat and Perou, 2009; Santarosa and Maestro, 2012).

La identificación de nuevos marcadores moleculares ha llevado a proponer la existencia de otros subtipos, como el denominado de baja claudina, caracterizado por una baja expresión de genes lumbinales y HER2, es decir, ER⁻/PR⁻/HER2⁻, pero con

una expresión incoherente de genes del grupo basal y una baja expresión de diversas claudinas y de E-cadherina, proteínas relacionadas con la adhesión celular (Herschkowitz et al., 2007; Prat and Perou, 2011). Por otro lado, un reciente estudio basado en el análisis de la expresión génica de diversos cánceres de mama triple negativos, permitió distinguir hasta seis subtipos diferentes dentro de este grupo tan diverso, entre ellos dos de tipo basal, uno inmunomodulador, dos de tipo mesenquimal, y un subtipo luminal que expresa receptores de andrógenos (AR) (Lehmann et al., 2011).

6.2.4. POSIBLE ORIGEN DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA

Muchos investigadores han especulado que estos subtipos tumorales definidos genómicamente pueden originarse a partir de la transformación maligna de diferentes tipos celulares que aparecen durante el desarrollo normal del epitelio mamario, siguiendo el “modelo de la célula de origen” (Lim et al., 2009; Melchor and Benitez, 2008; Prat and Perou, 2009; Prat and Perou, 2011). En este sentido, el estudio de la jerarquía de este tejido ha proporcionado un vínculo directo entre el desarrollo mamario y los perfiles moleculares de los distintos subtipos tumorales.

A partir de un estudio inmunohistoquímico desarrollado por Lim y cols., que estaba basado en la expresión de los marcadores superficiales CD49f y CD326 (EpCAM o ESA), fueron identificadas tres diferentes subpoblaciones epiteliales en el tejido mamario: i) CD49f⁺⁺/EpCAM⁻, ii) CD49f⁺/EpCAM⁺, iii) y CD49f⁻/EpCAM⁺; además de una subpoblación estromal CD49f⁻/EpCAM⁻ (Lim et al., 2009). El estudio del perfil genético de éstas, reveló que la subpoblación CD49f⁺⁺/EpCAM⁻ era ER⁻/PR⁻, y expresaba diversas citoqueratinas basales pero no citoqueratinas luminales; mientras que la subpoblación CD49f⁺/EpCAM⁺ expresaba tanto marcadores basales como luminales; y, por su parte, la subpoblación CD49f⁻/EpCAM⁺ sólo expresaba marcadores luminales maduros, entre ellos ER y PR. Por otro lado, observó que las células CD49f⁺⁺/EpCAM⁻ tenían capacidad de auto-renovación y eran las únicas con capacidad de regeneración mamaria completa (Lim et al., 2009; Prat and Perou, 2009).

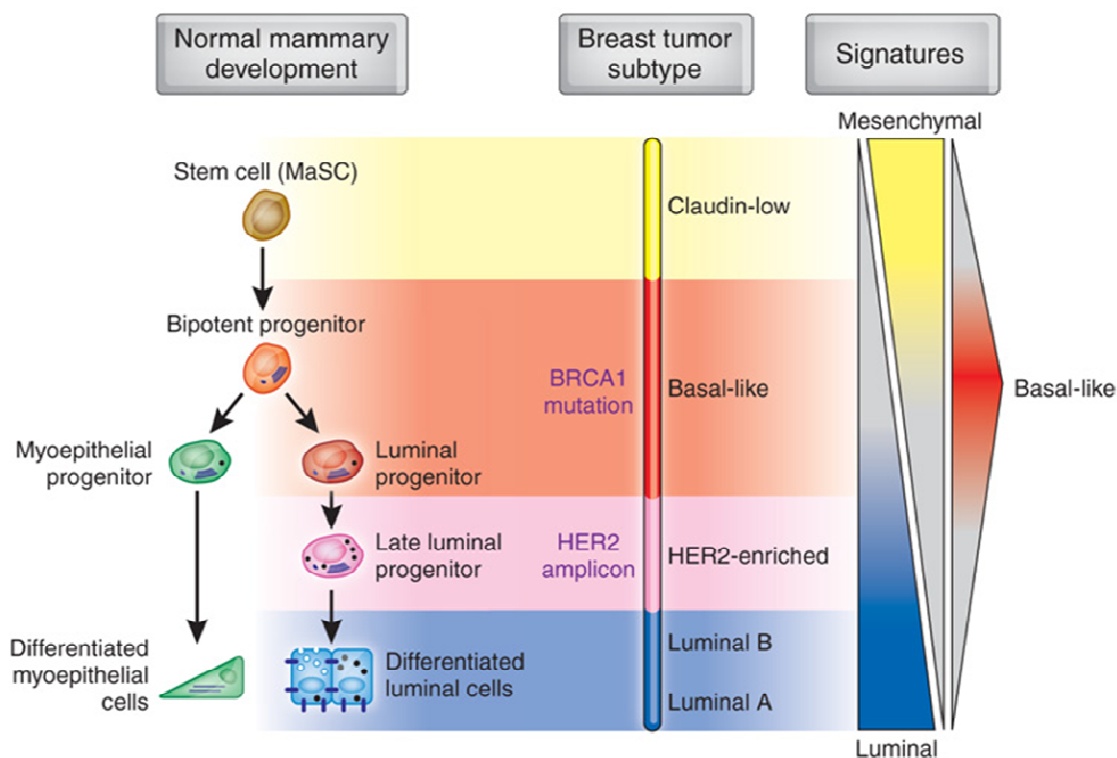


Figura 17. Posible origen de los subtipos moleculares de cáncer de mama según el modelo de la célula de origen (Imagen tomada de Prat and Perou, 2009)

Estas diferentes subpoblaciones celulares fueron denominadas como: i) células madre mamarias (MaSC) ($CD49f^{++}/EpCAM^{+}$), ii) células progenitoras luminales comprometidas ($CD49f^{+}/EpCAM^{+}$), iii) y células luminales maduras ($CD49f/EpCAM^{+}$). Además, Lim y cols. propusieron que el programa de diferenciación epitelial luminal seguía una jerarquía que se iniciaba en las MaSC, las cuales daban lugar a las células progenitoras luminales comprometidas que, en última instancia, originaban la progenie de células ductales y alveolares maduras, pertenecientes al linaje de células epiteliales que recubren el lumen de la glándula mamaria. Además, las MaSC también originarían los precursores de las células mioepiteliales que rodean el epitelio luminal y contactan con la membrana basal (Figura 17) (Lim et al., 2009; Prat et al., 2010; Prat and Perou, 2009).

La comparación de los perfiles de expresión de estas subpoblaciones epiteliales y los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama, ha demostrado la gran semejanza existente entre: las MaSC y los tumores del subtipo denominado de

baja claudina, las células progenitoras luminales y los carcinomas de tipo basal, y las células luminales maduras y los subtipos luminal A y luminal B. Por ello, se ha postulado que cada uno de estos subtipos se origina a partir de estas respectivas células de linaje epitelial que corresponden a un estado de diferenciación concreto durante el desarrollo del epitelio mamario (Figura 17) (Lim et al., 2009; Prat and Perou, 2011). Respecto a los tumores del subtipo HER2, caracterizados por una expresión de citoqueratinas luminales y una disminución de la expresión de citoqueratinas basales, se piensa que la célula potencial a partir de la cual se derivan podría representar un estado intermedio de diferenciación entre el progenitor luminal y la célula luminal madura, es decir, una célula progenitora luminal tardía (Figura 17) (Lim et al., 2009; Prat and Perou, 2009).

Además, se ha determinado que existe una estrecha relación entre las mutaciones en el gen *BRCA1*, la subpoblación de células progenitoras luminales y el desarrollo de los carcinomas de tipo basal (Lim et al., 2009; Prat and Perou, 2009). También, se cree que el origen del subtipo HER2 estaría mediado por un evento carcinogénico producido en una célula progenitora luminal tardía, que conllevara la amplificación/sobre-expresión del gen *HER2* (Melchor and Benitez, 2008; Prat and Perou, 2011). Por otro lado, aunque el perfil de expresión génica de los subtipos luminal A y luminal B es muy similar al de las células luminales maduras, los primeros muestran un peor pronóstico, lo que hace pensar que éstos pueden derivar de células ER⁻ muy comprometidas a la diferenciación luminal, lo que explicaría el hecho de que puedan mostrar una expresión variable de ER (Melchor and Benitez, 2008).

Respecto a los tumores del subtipo de baja claudina, éstos expresan genes mesenquimales, genes asociados a SC y genes relacionados con la EMT. Además, muestran una baja expresión de genes implicados en las uniones estrechas y la adhesión célula-célula, incluyendo tres diferentes claudinas, y una falta o baja expresión de genes luminales, HER2, E-cadherina, EpCAM y mucina-1, al igual que las MaSC. Además, están enriquecidos en células caracterizadas por la expresión de marcadores CD44⁺/CD24^{-/low} y con capacidad de formar mamosferas, características asociadas al fenotipo CSC en cáncer de mama. Todo ello hace pensar que estos tumores podrían estar enriquecidos con CSC, lo que les conferiría su carácter tan agresivo (Prat and Perou, 2011).

Por otra parte, algunos autores postulan otras hipótesis que difieren del modelo expuesto anteriormente para explicar el origen de estos diferentes subtipos moleculares. Así, también se ha propuesto que la célula de origen para todos ellos podría ser una MaSC, que al dividirse de forma asimétrica resultaría en una diferenciación celular, surgiendo los diferentes subtipos al detenerse en etapas específicas de la diferenciación, dependiendo de los eventos genéticos que están presentes en cada tumor en particular. Otros autores creen que estos subtipos tumorales no se originan a partir de SC, sino de alguna célula a lo largo de la jerarquía de diferenciación luminal, pero que el evento de transformación maligna le confiere a esta célula la capacidad de auto-renovación y características mesenquimales, postulando además que las CSC se originarían a partir de una célula diferenciada (Prat and Perou, 2011).

6.3. CÁNCER COLORRECTAL

6.3.1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más común en los hombres, representando el 10% del total de cánceres diagnosticados, y el segundo en las mujeres, con un 9,4%, en todo el mundo, según los últimos datos recogidos por la WHO referentes al año 2008 (Figura 11A-B). Casi el 60% de los casos ocurren en las regiones desarrolladas, y las tasas de incidencia son sustancialmente mayores en hombres que en mujeres. El riesgo de padecer este tipo de cáncer aumenta gradualmente con la edad, siendo la tasa de incidencia del $198,5/10^5$ en las personas mayores de 75 años. En España, el cáncer colorrectal ocupa el tercer puesto por incidencia entre los hombres, con un 13,9% del total, y el segundo en mujeres, representando un 15,4% (Ferlay et al., 2008).

Alrededor de 600.000 muertes por cáncer colorrectal se estimaron en todo el mundo durante el año 2008, lo que representa el 8% de todas las muertes por cáncer, y constituye la cuarta causa más común de muerte por neoplasias a nivel global, siendo estas tasas de mortalidad más bajas en mujeres que en hombres. En España, el cáncer colorrectal constituye la segunda causa de mortalidad por neoplasias tanto en los varones como en las mujeres. Según los datos recopilados durante el año 2008, algo más de 8.300 hombres y cerca de 6.000 mujeres murieron a causa de cáncer

colorrectal en nuestro país, lo que representa el 12,7% y el 15,6% de las muertes causadas por cáncer respectivamente (Ferlay et al., 2008).

Por otra parte, la recurrencia de este tipo de cáncer varía ampliamente en función del estadio en el que se detecte la enfermedad, representando una tasa de recurrencia del 0-13% en el estadio 1, y llegando a alcanzar un 32-88% en el estadio 3 (Hellinger and Santiago, 2006). En este sentido, la detección temprana del cáncer colorrectal aumenta enormemente el éxito de la cirugía. Actualmente existen diferentes técnicas de detección como el examen de sangre oculta en heces, la sigmoidoscopia o la colonoscopia. El avance de las técnicas de detección y la mejora en los tratamientos ha permitido que la tasa de supervivencia a esta enfermedad, medida a 5 años, se haya incrementado hasta alrededor del 50%, aunque esta tasa varía considerablemente en función de las técnicas de detección y los tratamientos disponibles, y entre regiones desarrolladas y en desarrollo (Boyle and Levin, 2008).

6.3.2. ETIOLOGÍA

Los principales agentes externos implicados en el desarrollo de cáncer de colon en los seres humanos son las bebidas alcohólicas, el consumo de tabaco, y las radiaciones X y gamma, siendo clasificados dentro del grupo 1 de carcinógenos por la IARC (Cogliano et al., 2011; IARC, 2012). Además del consumo de alcohol y tabaco, la obesidad también constituye un factor de riesgo de padecer cáncer de colon y recto (Khan et al., 2010), mientras que la actividad física es un factor positivo para la incidencia y el riesgo de recurrencia de esta patología (Davies et al., 2011). También se ha observado una importante implicación de la dieta en el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, debido a que la mucosa colorrectal está en contacto directo y constante con los componentes de los alimentos, y también está expuesta a los cambios metabólicos y fisiológicos inducidos por la dieta. La ingesta de alimentos como pescados ricos en ácidos grasos insaturados ω -3, pollo sin piel, productos lácteos, cereales, frutas y vegetales, reducen el riesgo de padecer este tipo de cáncer, mientras que una elevada ingesta de carne roja y procesada, huevos y colesterol lo aumentan (Hansen et al., 2012; Khan et al., 2010; Magalhaes et al., 2012).

En lo referente a la relación que existe entre determinados factores genéticos y el desarrollo de este tipo de cáncer, se estima que la predisposición hereditaria está

implicada en el 10-30% de casos de cáncer colorrectal. El gen de susceptibilidad más importante asociado a esta patología es el *APC*, apareciendo mutado en más del 80% de todos los casos de cáncer colorrectal (van Wezel et al., 2012). También se ha observado que mutaciones en la línea germinal de ciertos genes MMR, como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*, se asocian con un incremento del riesgo de padecer este tipo de cáncer (Goel and Boland, 2010). Otros genes de susceptibilidad al cáncer colorrectal son, por ejemplo, *SMAD7*, *BMPR1A* o *MUTYH*, el cual codifica para una proteína que se asocia al sistema MMR. Además, también se ha observado que deleciones del gen *GSTT1* incrementan el riesgo de cáncer colorrectal (Dong et al., 2008; van Wezel et al., 2012). Dentro de los síndromes hereditarios se incluyen, entre otros, la poliposis adenomatosa familiar (FAP), que se relaciona con defectos en el gen *APC* heredados en la línea germinal, y el cáncer de colon no poliposo hereditario (HNPCC) o síndrome de Lynch, causado por defectos heredados en genes MMR (van Wezel et al., 2012).

6.3.3. SUBTIPOS

Además de la clasificación clínica en función del estadio, clasificación TNM, y el grado de la enfermedad, la WHO hace una clasificación histológica de este tipo de tumores distinguiendo cuatro grupos principales (Tabla 5): i) tumores epiteliales, aquellos que se originan a partir del epitelio colorrectal; ii) tumores mesenquimales, los cuales se desarrollan a partir del tejido conectivo; iii) linfomas, tumores sólidos de linfocitos neoplásicos; iv) y tumores secundarios, originados por la metástasis de tumores primarios desarrollados en otros órganos. Dentro de esta clasificación histológica son especialmente importantes los carcinomas, un grupo de tumores epiteliales malignos del intestino grueso que se caracterizan por invadir la mucosa muscular hasta alcanzar la submucosa. Entre ellos se incluyen los adenocarcinomas, los cuales representan más del 90% de los carcinomas colorrectales, y que constituyen un tipo de neoplasias malignas originadas a partir del epitelio glandular de la mucosa colorrectal (Bosman et al., 2010).

En lo referente a la clasificación molecular de los distintos subtipos de cánceres colorrectales, ésta se basa generalmente en la determinación de alteraciones en diferentes vías implicadas en la progresión de la carcinogénesis colorrectal: i) la inestabilidad cromosómica (CIN), ii) la inestabilidad de microsatélites (MSI), iii) y la

Tabla 5. Clasificación histológica de los tumores de colon y recto
(adaptado de Bosman et al., 2010)

Epithelial tumours	Neuroendocrine neoplasms
Premalignant tumours	Neuroendocrine tumour (NET)
Adenoma	NET G1 (carcinoid)
Tubular	NET G2
Villous	Neuroendocrine carcinoma (NEC)
Tubulovillous	Large cell NEC
Dysplasia (intraepithelial neoplasia), low grade	Small cell NEC
Dysplasia (intraepithelial neoplasia), high grade	Mixed adenoneuroendocrine carcinoma
Serrated lesions	EC cell, serotonin-producing NET
Hyperplastic polyp	L-cell, glucagon-like peptide and PP/PYY-producing NETs
Sessile serrated adenoma/polyp	
Traditional serrated adenoma	
Hamartomas	Mesenchymal tumours
Cowden-associated polyp	Leiomyoma
Juvenile polyp	Lipoma
Traditional serrated adenoma	Angiosarcoma
Carcinomas	Gastrointestinal stromal tumour
Adenocarcinoma	Kaposi sarcoma
Cribriform comedo-type adenocarcinoma	Leiomyosarcoma
Medullary carcinoma	
Micropapillary carcinoma	Lymphomas
Mucinous adenocarcinoma	
Serrated adenocarcinoma	
Signet ring cell carcinoma	Secondary tumours
Adenosquamous carcinoma	
Spindle cell carcinoma	
Squamous cell carcinoma	
Undifferentiated carcinoma	

inestabilidad epigenética debida a un fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) (Kang, 2011; Legolvan et al., 2012; Pancione et al., 2012). Según el grado de inestabilidad, la MSI puede ser subdividida a su vez en tres grupos: i) alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H), ii) baja inestabilidad de microsatélites (MSI-L), iii) y microsatélites estables (MSS) (Jass, 2007). Por otro lado, en función de la inestabilidad epigenética han sido identificados tres epigenotipos distintos: i) de alta metilación (HME), ii) de metilación intermedia (IME), iii) y de baja metilación (LME) (Kaneda and Yagi, 2011).

La CIN es la causa más frecuente de inestabilidad genómica, y abarca el 80-85% de todos los cánceres colorrectales. La CIN provoca frecuentemente anomalías en el cariotipo, con ganancias y pérdidas cromosómicas que pueden afectar a genes como *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *SMAD4* y *TP53*, entre otros, y ha sido asociada con un peor pronóstico de la enfermedad. Por otra parte, la MSI representa aproximadamente el 15% de todos los cánceres colorrectales, habiéndose observado que el mecanismo implicado en la MSI está mediado por deficiencias en el sistema MMR. Aunque la inestabilidad genómica es el fenómeno más común en el cáncer colorrectal, la inestabilidad epigenética, especialmente la metilación del DNA, es también un mecanismo importante en la patogénesis del cáncer colorrectal, siendo la causa más común de inactivación de enzimas MMR responsables de la MSI (Legolvan et al., 2012).

Una de las primeras clasificaciones de este tipo de cánceres basada en aspectos moleculares, empleaba el estudio del tipo de inestabilidad genómica y la existencia de mutaciones en los genes *BRAF* y *KRAS*, permitiendo diferenciar hasta cinco subtipos moleculares de cáncer colorrectal: i) tipo 1, CIMP-high/MSI-H/*BRAF* mutado; ii) tipo 2, CIMP-high/MSI-L o MSS/*BRAF* mutado; iii) tipo 3, CIMP-low/MSS o MSI-L/*KRAS* mutado; iv) tipo 4, CIMP-neg/MSS; v) y tipo 5, CIMP-neg/MSI-H (Jass, 2007). Algunos autores sólo se basan en el estudio del estado MSI y CIMP, lo que permite la identificación de cuatro subtipos moleculares diferentes de cánceres colorrectales: i) CIMP+/MSI+, ii) CIMP+/MSI-, iii) CIMP-/MSI+, iv) y CIMP-/MSI-. Los más frecuentes son los del subtipo CIMP-/MSI-, llegando a representar aproximadamente el 80% de todos los cánceres colorrectales, mientras que el subtipo CIMP+/MSI- es el que muestra peor pronóstico clínico, especialmente cuando además está acompañado de mutaciones en *KRAS* y/o *BRAF* (Kang, 2011). Por otro lado, en

un artículo publicado recientemente han sido identificados tres subtipos de cánceres colorrectales en base al perfil de expresión de mRNA y miRNA a partir de estadios iniciales de la enfermedad: i) subtipo alto en estroma, ii) subtipo bajo en estroma, iii) y subtipo mucinoso. El subtipo alto en estroma presenta elevadas las vías de transducción y los genes específicos de ECM y comunicación celular al contrario que el subtipo bajo en estroma, mientras que el subtipo mucinoso tiene elevados los niveles de mucinas y factores trefoil además de mostrar una alta proporción de MSI y mutaciones del gen *BRAF*. Dentro de esta clasificación, se ha observado que el subtipo bajo en estroma muestra un mayor tiempo de supervivencia (Perez-Villamil et al., 2012).

6.3.4. POSIBLE ORIGEN DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE CÁNCER COLORRECTAL

En el proceso carcinogénico que da lugar al desarrollo de un determinado subtipo de cáncer colorrectal han sido identificadas tres vías patogénicas diferentes, en base al factor iniciador del proceso: i) vía supresora, también denominada como vía de la CIN; ii) vía mutadora, o vía de la MSI, iii) y vía serrada, también conocida como vía del CIMP (Asaka et al., 2009; Pancione et al., 2012). Típicamente, predomina un tipo de firma molecular sugiriendo que las tres vías rara vez se superponen, aunque en algunos casos éstas no son excluyentes. Así, por ejemplo, una compleja interacción se produce en algunos tumores mediante la cual una vía es el resultado de otra, como ocurre cuando se produce la hipermetilación de genes MMR por un CIMP, que conlleva a la aparición de una MSI (Pancione et al., 2012).

La vía supresora ocurre generalmente en los tumores hereditarios, como la FAP, y también es responsable de la mayor parte de los cánceres colorrectales esporádicos (Pancione et al., 2012). Esta vía se asocia con la desregulación de la ruta de señalización Wnt, mediada por la pérdida del regulador negativo *APC*, que da lugar a una lesión precancerosa adenomatosa, a la cual le siguen ciertos pasos genéticos que afectan a diversos genes supresores de tumores y oncogenes, en lo que se conoce como secuencia adenoma-carcinoma (Figura 18) (Asaka et al., 2009; Legolvan et al., 2012). En lo referente a la vía mutadora, ésta es responsable del síndrome de Lynch y de algunos tumores esporádicos, y es causada principalmente por la inactivación de genes MMR tales como *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* o *hPMS2*. Los

cánceres colorrectales que siguen la vía mutadora tienden a ser del lado derecho, generalmente tienen altos grados histológicos, un fenotipo mucinoso y suelen ser diagnosticados en bajos estadios patológicos a diferencia de los cánceres de la vía supresora (Pancione et al., 2012). Por su parte, la vía serrada cursa a través de lesiones precursoras serradas, y da lugar a cánceres asociados con la edad, de localización proximal, pobre diferenciación y que no presentan mutaciones en el gen *TP53* pero sí en *BRAF*. Esta vía está muy correlacionada con un fenotipo de MSI, con la metilación de *MLH1*, y la mutación *BRAF* (Legolvan et al., 2012).

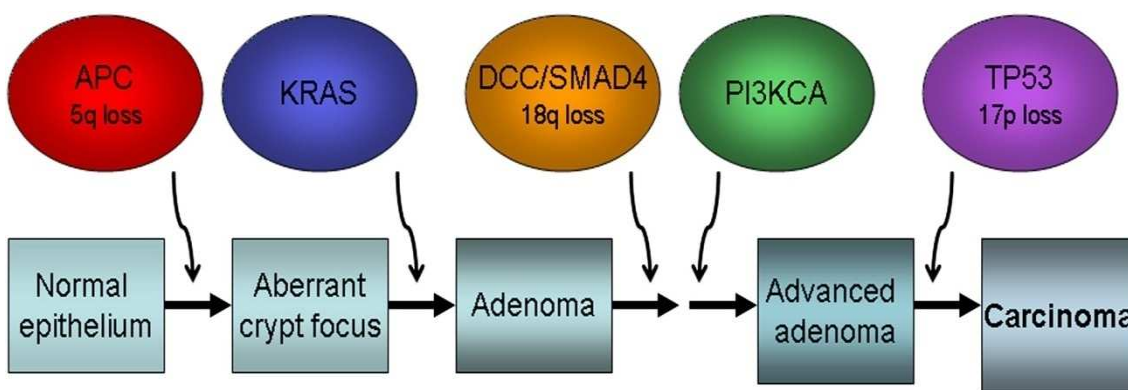


Figura 18. Secuencia adenoma-carcinoma causada por inestabilidad cromosómica observada en la vía supresora (Imagen tomada de Legolvan et al., 2012)

Respecto a los cánceres que se desarrollan a través de la vía supresora, se cree que la célula de origen de éstos la constituye una población de SC presentes en las criptas colónicas (Figura 19) (Barker et al., 2009; Degirolamo et al., 2011; Visvader, 2011; Vries et al., 2010). El colon tiene una superficie epitelial plana, compuesta por colonocitos, células enteroendocrinas y células de Goblet, que se invagina para formar criptas. La estructura de estas criptas puede subdividirse en tres regiones principales: i) una región basal, en la que se localizan las SC encargadas de renovar el epitelio colónico; ii) una región intermedia, en la que las células progenitoras originadas a partir de las SC proliferan y se diferencian, que es denominada también como compartimento amplificador de tránsito (TA); iii) y una región superior, compuesta por células diferenciadas (Figura 19) (Degirolamo et al., 2011). Debido a su localización, estas SC fueron denominadas como células de la base columnar de la cripta (CBC), aunque también se las conoce como SC de larga vida, y se caracterizan fenotípicamente por expresar el receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene

repeticiones ricas en leucina (LGR5). Según algunos estudios, estas SC LGR5⁺ son las potenciales células de origen de las lesiones adenomatosas que dan lugar a este tipo de cánceres (Figura 19) (Barker et al., 2009; Degirolamo et al., 2011; Visvader, 2011; Vries et al., 2010).

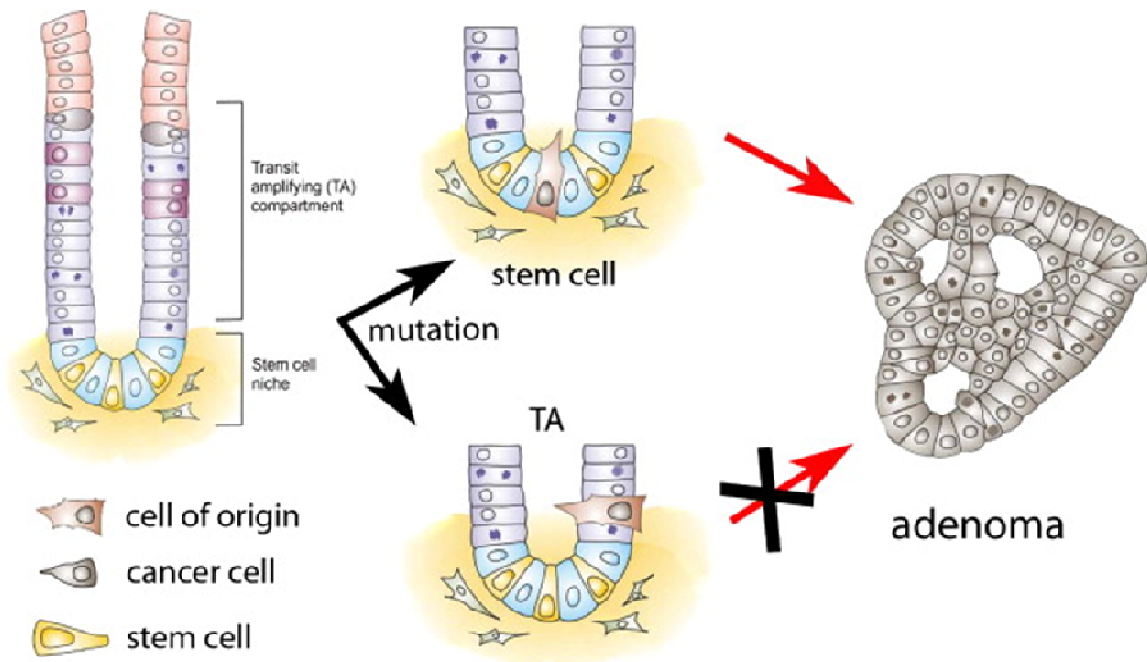


Figura 19. Estructura de las criptas colónicas y posible célula de origen de los adenomas que surgen por la inactivación del gen *APC* (Imagen tomada de Vries et al., 2010)

7. CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

7.1.1 SIMILITUDES CON LAS CÉLULAS MADRE NO TUMORALES

Como se ha comentado con anterioridad, la relación de las SC con los tumores fue ya propuesta a mediados del siglo XIX (Cohnheim, 1867; Virchow, 1855). En la actualidad, existen multitud de evidencias que indican que la mayoría de los cánceres, si no todos, dependen de una pequeña población de células, denominadas como células madre cancerígenas (del inglés "cancer stem cells", CSC). Éstas permiten el continuo crecimiento y expansión del tumor, lo que ha hecho postular que los tumores

puedan originarse a partir de la transformación maligna de células individuales de la población de SC del organismo (Kucia and Ratajczak, 2006). Los avances en el estudio de la biología de las SC y las CSC han aportado una gran abundancia de conocimiento en lo referente a las características similares que estas dos poblaciones celulares comparten.

Las CSC, al igual que las SC, muestran una capacidad de auto-renovación ilimitada, que las hace esencialmente inmortales. En esta característica de las CSC están involucradas, a nivel molecular, varias rutas de señalización similares a las que participan en la auto-renovación de las SC, como las rutas Wnt, Notch o Hh, así como diversos genes de la familia *Policomb*, como el *BMI1*, o genes de la familia *HOX* (Jiang et al., 2009b; Kucia and Ratajczak, 2006; Lobo et al., 2007; Piscaglia, 2008). Ambos tipos de células muestran la capacidad de sufrir dos tipos de división celular que aseguran su auto-renovación, simétrica y asimétrica (Verga Falzacappa et al., 2012), y además comparten la capacidad de diferenciarse, aunque, mientras que las SC generan una progenie normal, las CSC a menudo se diferencian anormalmente (Kucia and Ratajczak, 2006). En este sentido, las CSC pueden dar lugar a cualquier tipo celular de la población tumoral, siendo esta progenie de células cancerosas más diferenciadas, las cuales muestran una capacidad limitada o nula de auto-renovación y están destinadas a detener su proliferación o morir (Lobo et al., 2007; Piscaglia, 2008).

También se ha observado que las CSC pueden mantenerse en un estado de quiescencia (Kucia and Ratajczak, 2006; Piscaglia, 2008). En los tejidos normales, las ASC pueden permanecer quiescentes bajo el control tanto de mecanismos reguladores intrínsecos como de señales extrínsecas del microambiente, pero son capaces de salir de este estado, expandiéndose rápidamente y diferenciándose en respuesta a diversas señales. La capacidad de las CSC para permanecer en un estado quiescente las hacen más resistentes a las terapias convencionales y dirigidas, y también puede explicar el hecho de que algunos cánceres, como el de mama o colon, puedan presentar recurrencia incluso una década después del tratamiento inicial (Li and Bhatia, 2011). Por otro lado, tanto las SC como las CSC tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento, citoquinas y factores angiopoyéticos y, por lo tanto, muestran una predisposición para mantener un crecimiento autocrino y para estimular la angiogénesis, un aspecto crítico para el mantenimiento de los tumores (Kucia and Ratajczak, 2006; Piscaglia, 2008). Además, se ha determinado

que existe un paralelismo entre la metástasis mediada por las CSC y la movilización de las SC. En este sentido, se ha observado en ambos casos la implicación del receptor CXCR4 y su ligando SDF-1. Esto también determina que el eje SDF-1-CXCR4 puede influir en la biología de los tumores y dirigir la metástasis de las células tumorales CXCR4⁺ por quimioatracción hacia los órganos que expresan altos niveles de SDF-1, como el pulmón, el hígado, la médula ósea o los ganglios linfáticos (Hermann et al., 2007; Kucia and Ratajczak, 2006; Li and Neaves, 2006).

Otras características que comparten las SC y las CSC son una elevada actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Ma and Allan, 2011) y una alta expresión de diversos transportadores de membrana dependientes de ATP (del inglés, "ATP-binding cassette", ABC) (Kucia and Ratajczak, 2006). La ALDH es una enzima intracelular implicada en el metabolismo del ácido retinoico, y se cree que también puede desempeñar importantes funciones relacionadas con la auto-protección, la diferenciación y la expansión celular. Dentro de la gran familia ALDH, se ha demostrado que diversos miembros están directamente implicados en la biología de las CSC, así como de las SC, como por ejemplo: i) la familia ALDH1, entre las que se incluyen ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1L1 y ALDH1L2; ii) ALDH2*2, que se relaciona con el riesgo de cáncer inducido por el alcohol; iii) ALDH3A1, que confiere un alto grado de protección a estas células, y que se cree juega un importante papel en tumores dependientes de hormonas; iv) ALDH4A1, que se relaciona con TP53 y el daño en el DNA; v) y ALDH7A1, que está involucrada en la regulación del ciclo celular (Ma and Allan, 2011). Respecto a los transportadores ATP, éstos constituyen bombas de eflujo de resistencia a multidroga (MDR), y les confieren a estas células una resistencia a fármacos y otras toxinas (Kucia and Ratajczak, 2006). Algunos de estos transportadores de eflujo son expresados tanto en SC normales como en CSC, entre los que se incluyen diversas proteínas de la familia de los transportadores de membrana ABC. La sobre-expresión de determinados transportadores MDR en las CSC está relacionada con la resistencia de amplio espectro de éstas a multitud de fármacos (Lobo et al., 2007).

En adición a las características expuestas anteriormente, diversos estudios también han demostrado que ambos tipos celulares muestran una activa capacidad de reparación del DNA (Kucia and Ratajczak, 2006; Lobo et al., 2007) y son resistentes a la apoptosis (Gil et al., 2008; Kucia and Ratajczak, 2006). En lo que respecta a la

capacidad de reparación del DNA, se ha observado que tanto las SC como las CSC son capaces de reparar las roturas de doble cadena del DNA causadas por la radiación γ , habiéndose determinado en algunos casos un aumento de la actividad de la vía de reparación del DNA mediada por la quinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM) (Lobo et al., 2007).

7.1.2. AUTO-RENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA EN LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

Aunque las SC y las CSC comparten importantes similitudes funcionales, tales como su capacidad de auto-renovación y su potencial de diferenciación; sin embargo, poseen diferentes comportamientos biológicos, debido principalmente a la profunda desregulación de la capacidad de auto-renovación de las CSC. Las diferencias en el modo de división, las propiedades del ciclo celular, el potencial replicativo y la reparación de daños en el DNA, además de la activación / inactivación de vías moleculares específicas para el cáncer, confieren a las CSC un fenotipo maligno (Verga Falzacappa et al., 2012). Algunas de las rutas de señalización que aparecen desreguladas en estas células, están relacionadas con la auto-renovación, diferenciación y supervivencia de las SC órgano-específicas y las ESC. Entre ellas se encuentran principalmente implicadas las rutas de señalización Wnt, Notch y Hh, aunque también otras como las rutas JAK/STAT, MAPK/ERK, PI3K/AKT y TGF- β (Roy and Majumdar, 2012; Subramaniam et al., 2010).

La ruta de señalización Wnt es una de las más conservadas evolutivamente, y está implicada en una variedad de actividades celulares, embriológicas y fisiológicas en diferentes organismos, incluido el ser humano (Dreesen and Brivanlou, 2007). Las proteínas de la familia WNT ejercen su acción principalmente a través de la familia de receptores transmembrana Frizzled mediante dos rutas distintas: i) la vía canónica WNT/ β -catenina, ii) y una vía no canónica que controla la polaridad celular planar y la extensión convergente (Mikryukov and Moss, 2012). Durante la transducción de señal que se produce en la vía canónica, se inhibe la degradación de la β -catenina citoplasmática, por parte de un complejo multiproteico del cual forma parte la proteína APC, y ésta es translocada al núcleo donde forma un complejo con TCF/LEF y activa la transcripción de determinados genes diana entre los que se incluyen *c-MYC* y *CD44* (Figura 20) (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011). Esta ruta se ha visto desregulada

en diferentes tipos tumorales, y ha sido demostrada su importancia en la biología de las CSC en leucemia, melanoma, mama, colon, hígado y pulmón. La activación de esta ruta es una característica clave de los cánceres epiteliales y se considera como un evento crítico para la EMT implicada en la metástasis (Aalaoui-Jamali et al., 2011; Hu and Fu, 2012).

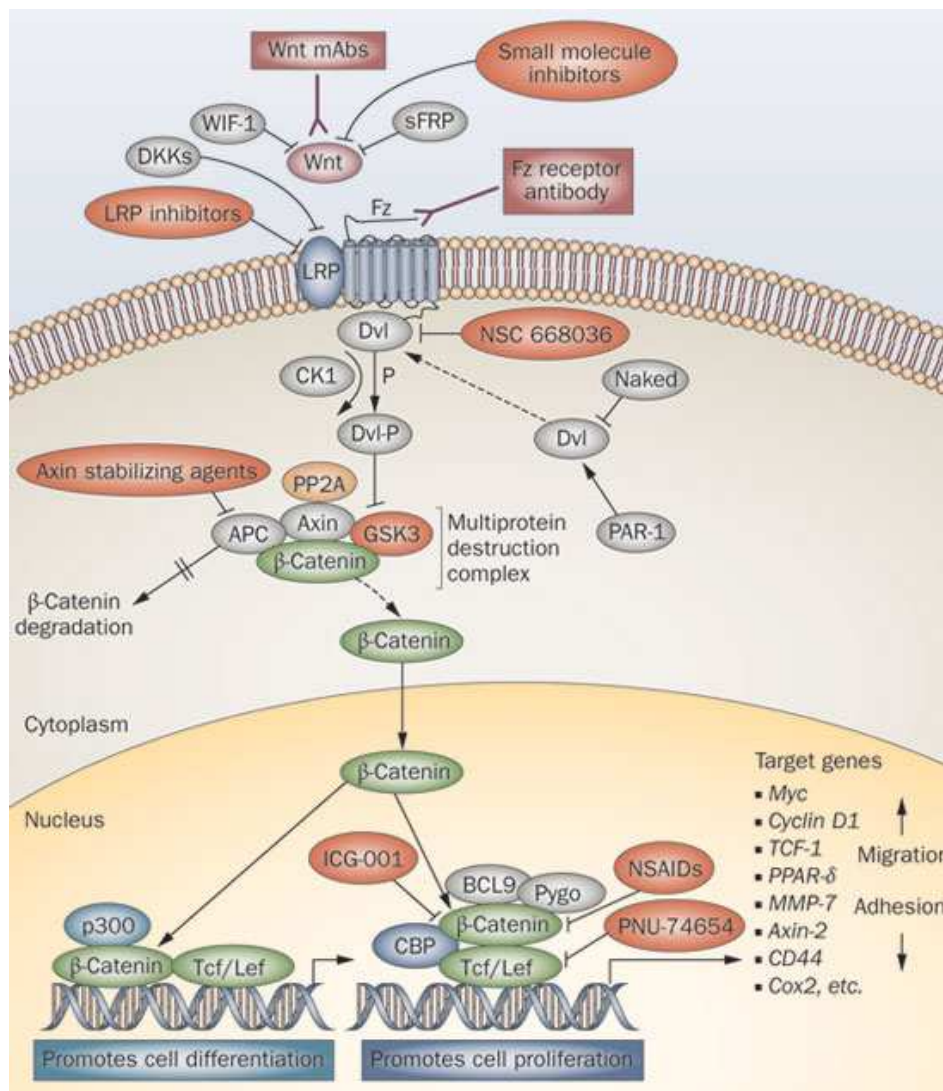


Figura 20. Representación esquemática de la vía canónica de la ruta Wnt y posibles estrategias terapéuticas dirigidas frente a células madre cancerígenas (CSC) (Imagen tomada de Takebe et al., 2011)

La ruta de señalización Notch juega un papel clave en la decisión del destino celular, estando implicada en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, aunque también está relacionada con la vasculogénesis y angiogénesis (Guo et al.,

2011; Reedijk et al., 2008). La familia de receptores NOTCH se compone de cuatro miembros, NOTCH1-4, los cuales se caracterizan por presentar un dominio extracelular con repeticiones de tipo EGFR y un dominio transmembrana (Hu and Fu, 2012). La expresión de estos receptores es regulada por hipoxia y por citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y leptinas (Guo et al., 2011). Dos familias distintas de ligandos pueden unirse a estos receptores: i) la familia de ligandos tipo Delta (DLL), de la que se han identificado tres miembros principales, DLL1, 3 y 4; ii) y los ligandos Jagged1 y 2 (Takebe et al., 2011). La unión ligando-receptor entre células adyacentes durante el contacto célula-célula provoca un cambio conformacional del receptor NOTCH que deja expuesto un sitio de escisión proteolítica. La acción de metaloproteasas y proteasas de la familia γ -secretasa da lugar a dos fragmentos, uno extracelular y otro intracelular. El dominio intracelular NOTCH (NICD) soluble activado, una vez liberado al citoplasma se transloca al núcleo donde se une al complejo de iniciación de la transcripción y al factor de unión nuclear 1 (CBF1), modulando así la expresión de genes NOTCH específicos, entre los que se incluyen genes de la familia *HES* y *HEY*, *c-MYC* y *p21* (Figura 21) (Guo et al., 2011; Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011). La desregulación de la ruta Notch se ha demostrado que está implicada en el mantenimiento de las propiedades CSC en diferentes tipos de cáncer como glioblastoma, mama o colon, entre otros (Hu and Fu, 2012; Roy and Majumdar, 2012). Además, algunos estudios indican que esta ruta participa sinérgicamente junto a la ruta Wnt para mantener la homeostasis de las SC y células progenitoras a través de la inhibición de la diferenciación terminal (Subramaniam et al., 2010).

En lo que respecta a la ruta de señalización Hh, se ha visto que juega un papel crucial en la embriogénesis de vertebrados mediante el control del destino celular, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación. En el organismo adulto, la señalización Hh se mantiene activa y está implicada en la regulación de la homeostasis y polaridad tisular, la regeneración y el mantenimiento de las SC (Subramaniam et al., 2010; Takebe et al., 2011). En mamíferos, la activación de esta ruta está mediada por la unión al receptor PTCH1 de tres ligandos diferentes denominados Sonic Hedgehog (SHh), Desert Hedgehog (DHH) e Indian Hedgehog (IHH) (Figura 22) (Hu and Fu, 2012). La unión ligando-receptor provoca que PTCH1 deje de inhibir al receptor Smoothed (SMO), lo que provoca que se produzca la transducción de señal que está mediada por la activación de diversos factores de transcripción de la familia GLI (Figura 22). De ellos, GLI1 actúa como activador de la

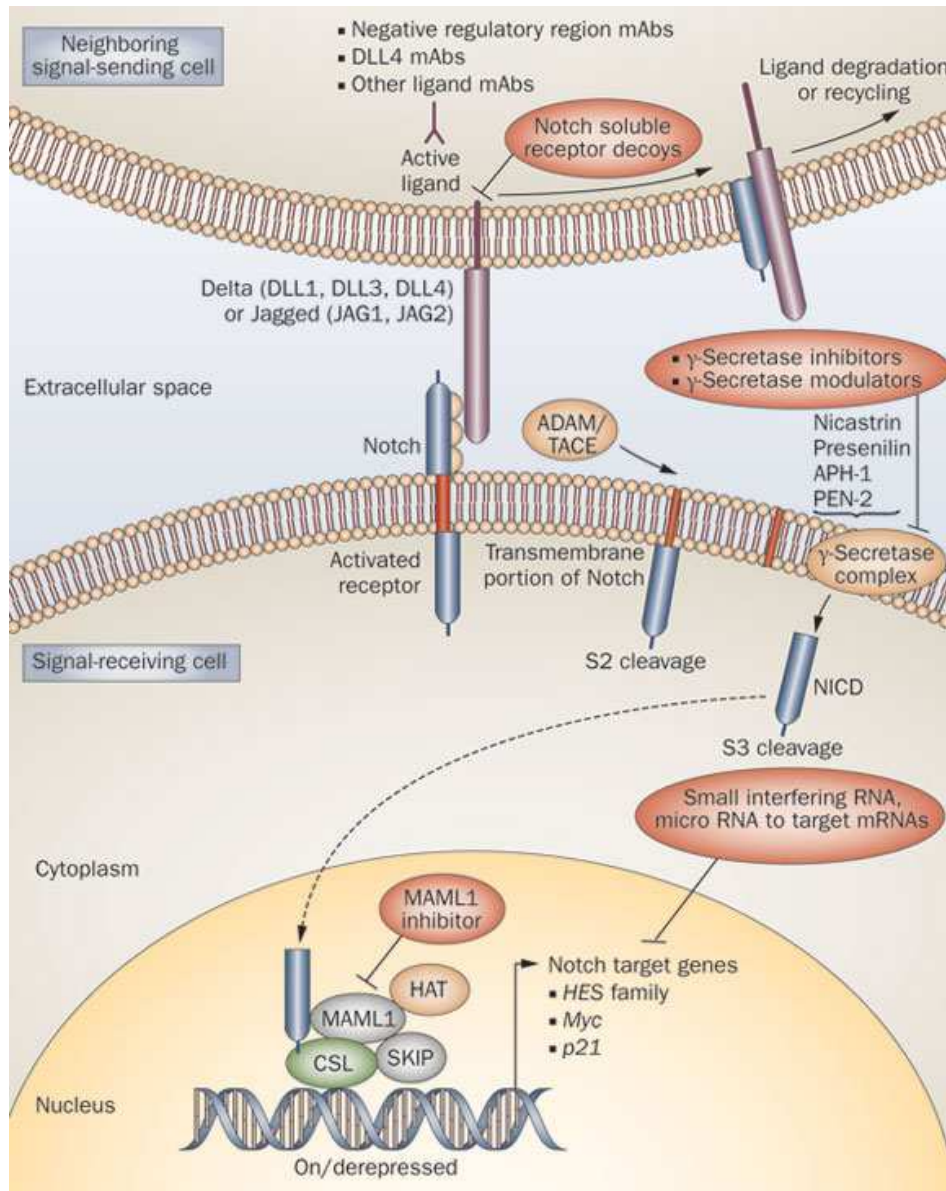


Figura 21. Representación esquemática de la ruta Notch y posibles estrategias terapéuticas dirigidas frente a células madre cancerígenas (CSC) (Imagen tomada de Takebe et al., 2011)

transcripción de genes Hh, GLI2 puede actuar como activador o represor, mientras que GLI3 actúa como represor de la transcripción de estos genes. Entre los genes que son expresados a través de la ruta Hh se encuentran *c-MYC*, *GLI1* o *PTCH* por ejemplo (Figura 22) (Takebe et al., 2011). Esta ruta de señalización se ha visto activada de forma aberrante en diferentes tipos de cáncer como glioblastoma, mama, colon, pulmón o páncreas, entre otros; y los datos obtenidos en diferentes estudios sugieren que participa en la regulación de las CSC (Hu and Fu, 2012; Roy and Majumdar, 2012; Subramaniam et al., 2010). Además, se ha demostrado que la ruta

SHh induce la expresión de ANG1-2, así como de proteínas de la familia VEGF por parte de células mesenquimales, destacando la importancia de las células asociadas al tumor, como los TAF, en combinación con la señalización SHh para mediar la formación de vasos sanguíneos en los tumores (Subramaniam et al., 2010).

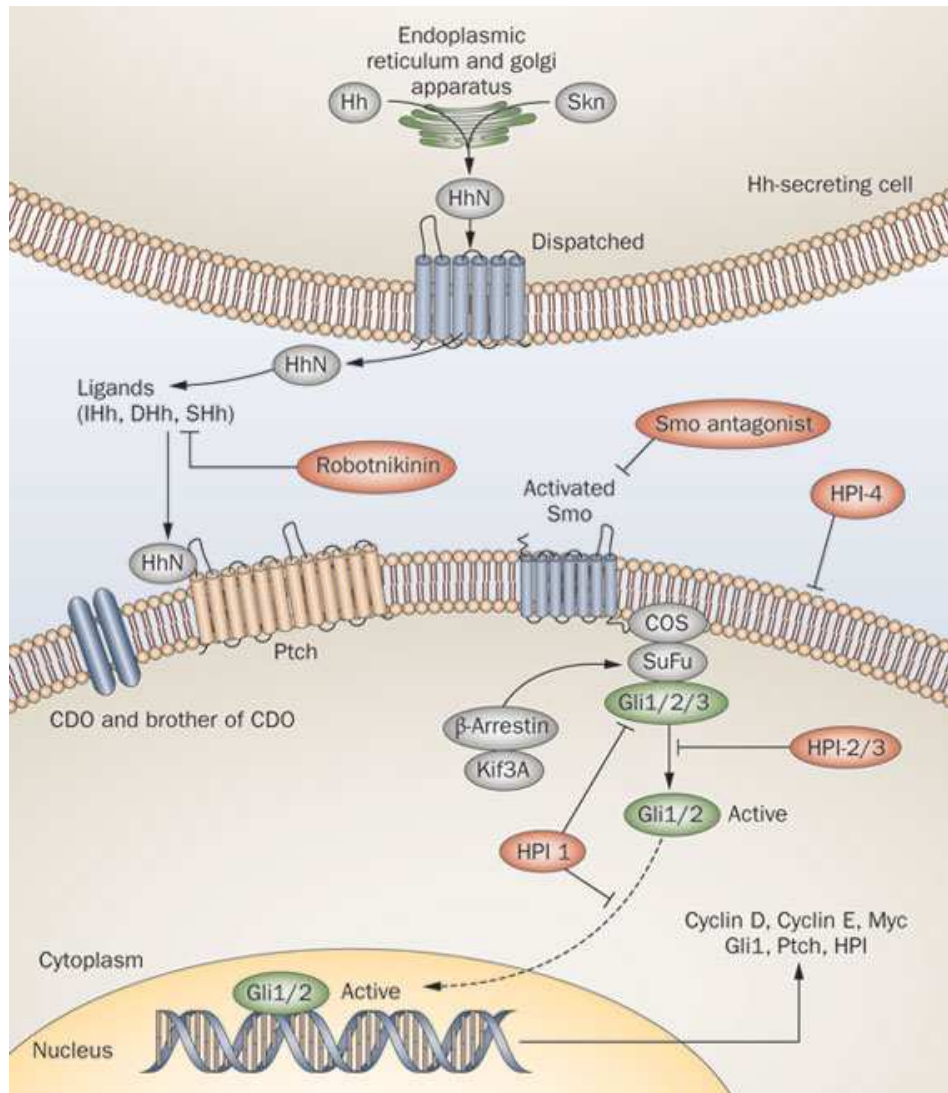


Figura 22. Representación esquemática de la ruta Hedgehog (Hh) y posibles estrategias terapéuticas dirigidas frente a células madre cancerígenas (CSC)
(Imagen tomada de Takebe et al., 2011)

Además de la importancia de estas rutas de señalización en la biología de las CSC, varios factores de transcripción de células madre embrionarias (ESC-TF), involucrados en la auto-renovación y la pluripotencia de las ESC, se encuentran sobre-expresados en diversos cánceres, y se ha postulado que éstos también pueden ser

responsables del fenotipo CSC. Entre estos ESC-TF se incluyen OCT4, SOX2, KLF4, NANOG, c-MYC y LIN28 (Patra et al., 2011; Prud'homme, 2012; Vaiopoulos et al., 2012). La importancia de estos ESC-TF en el mantenimiento de un estado indiferenciado ha sido demostrada en diferentes estudios, ya que son capaces de inducir la pluripotencia de células somáticas, permitiendo la generación de células iPS (Ohmine et al., 2012; Takahashi et al., 2007). Además, estos ESC-TF median la expresión de familias de miRNA que regulan a su vez la expresión de genes implicados en auto-renovación y pluripotencia. Así por ejemplo, se ha visto que los agregados de miR302-367, miR371-373, miR17-92 y miR106 están involucrados en el mantenimiento de la auto-renovación y pluripotencia de las ESC, y son considerados como miRNA oncogénicos (Lipchina et al., 2012; Martinez and Gregory, 2010).

7.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

7.2.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

Una de las principales características empleadas para la identificación de CSC la constituye la expresión diferencial de marcadores de superficie específicos por parte de estas células. En este sentido, han sido propuestos una gran variedad de marcadores superficiales para la identificación de poblaciones celulares de CSC en diferentes tipos tumorales, entre los que se incluyen, por ejemplo, CD133 (PROM1), CD44, CD34, CD24, CD166 (ALCAM), CD326 (EpCAM o ESA), CD90 (THY1), CD49, CD184 (CXCR4), CD20, CD38 o CD19, entre otros (Hermann et al., 2010; La Porta, 2012; Ma and Allan, 2011; Vaiopoulos et al., 2012; Visvader and Lindeman, 2008; Willis et al., 2008; Zabierowski and Herlyn, 2008).

Uno de los marcadores más comúnmente utilizados para definir poblaciones enriquecidas de CSC en multitud de tipos tumorales es el CD133. Esta glicoproteína transmembrana es considerada como un marcador de SC y células progenitoras, y se encuentra sobre-expresada en diferentes tipos celulares como HSC, EPC y SC órgano-específicas de diferentes tejidos. Su función fisiológica, así como sus ligandos y mensajeros secundarios específicos no se conocen con exactitud, aunque se cree que está implicada en la organización de la membrana plasmática, y algunos estudios indican que la expresión de CD133 en CSC puede estar relacionada con la movilidad celular y la capacidad de formación de esferas (Elsaba et al., 2010; Kusumbe et al.,

2009; Vaiopoulos et al., 2012). La selección de células CD133⁺, ya sea mediante citometría de flujo (del inglés “fluorescence-activated cell sorting”, FACS) como por partículas magnéticas (del inglés “magnetic-activated cell sorting”, MACS), en tumores sólidos y/o líneas celulares tumorales, ha permitido obtener subpoblaciones de CSC con capacidad para restablecer la heterogeneidad del tumor original en modelos animales inmunodeficientes (O'Brien et al., 2007; Rowebl et al., 2008). No obstante, recientes investigaciones demuestran que CD133 se expresa también en células diferenciadas, y también se ha observado que tanto subpoblaciones CD133⁺ como CD133⁻ de células tumorales metastásicas poseen la capacidad de inducir carcinogénesis a largo plazo en ratones inmunodeprimidos (Shmelkov et al., 2008).

Otro marcador de superficie ampliamente empleado en el estudio de las CSC es el CD44, una glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión célula-célula y célula-ECM que regula la motilidad y la proliferación celular, y que también se ha relacionado con el crecimiento tumoral, la invasión celular y la metástasis (Liu et al., 2010a; Lorico and Rappa, 2011; Uchino et al., 2010). La expresión de este marcador se ha observado en multitud de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de mama, colon, páncreas, próstata, ovario, cabeza y cuello; relacionándose en todos los casos con el fenotipo CSC (Al-Hajj et al., 2003; Chikamatsu et al., 2011; Dalerba et al., 2007; Li et al., 2009; Maitland and Collins, 2008; Meng et al., 2012).

En cuanto a CD24, una glicoproteína de membrana involucrada en la adhesión celular, se ha visto que participa en la progresión tumoral y la metástasis en algunos tipos de cáncer (Lee et al., 2008), y sólo puede considerarse como marcador de CSC en algunos tumores sólidos. Por ejemplo, mientras que la expresión de CD24 se ha observado en subpoblaciones de CSC en tumores de hígado (Lee et al., 2011), colon (Yeung et al., 2010) y páncreas (Li et al., 2009), el fenotipo de CSC de cáncer de mama se asocia con una baja o nula expresión de CD24 (Al-Hajj et al., 2003), al igual que ocurre en otros tumores sólidos como el de próstata (Hurt et al., 2008) y ovario (Meng et al., 2012).

Otro marcador utilizado para el aislamiento de CSC es CD326, una molécula de adhesión de células epiteliales que puede actuar como receptor de diversos factores de crecimiento y participar en la migración, proliferación y diferenciación celular (Trzpis et al., 2007). Se ha observado que este marcador superficial aparece

altamente expresado en CSC de una gran variedad de tumores, como por ejemplo mama, colon, páncreas o pulmón, entre otros (Dalerba et al., 2007; Karimi-Busheri et al., 2012; Li et al., 2009; Wang et al., 2012b). La expresión de este marcador en CSC se ha relacionado con un incremento de la proliferación, migración, invasión y metástasis tumoral (Munz et al., 2009; Trzpis et al., 2007).

Para el correcto aislamiento de CSC suele recurrirse al estudio de más de un biomarcador, lo que permite una mejor selección de esta población celular dentro del conjunto de células que constituyen el tumor. De hecho, se vienen empleando diferentes combinaciones de marcadores superficiales dependiendo del tipo tumoral, por ejemplo: i) CD34⁺/CD38⁻ en leucemia (Lapidot et al., 1994), ii) CD133⁺/CD20⁺ en melanoma (Zabierowski and Herlyn, 2008), iii) CD24⁺/CD44⁺/CD326⁺ en páncreas (Li et al., 2009), iv) o CD44⁺/CD24⁻ en ovario y próstata (Hurt et al., 2008; Meng et al., 2012).

Aparte del estudio de la expresión de marcadores de superficie, otro método utilizado para la purificación de CSC consiste en la tinción con Hoechst 33342, un colorante fluorescente permeable a la membrana celular que se incorpora al DNA entre las secuencias "AT" (Christgen et al., 2012; Wu and Alman, 2008). Esta técnica fue empleada por primera vez para purificar SC a partir de células de médula ósea de ratón (Goodell et al., 1996). Goodell y cols. observaron que el colorante Hoechst 33342 emite 2 tipos de fluorescencia, con longitudes de onda de 450 nm y 650 nm, al ser irradiado con luz UV. Al llevar a cabo un análisis bi-dimensional de las células teñidas midiendo la intensidad de fluorescencia emitida a 675 nm y a 450 nm, observaron la existencia de una población celular que mostraba una baja intensidad de fluorescencia para ambas longitudes de onda con un alto contenido en HSC.

La eliminación del colorante Hoechst 33342 es mediada por la sobre-expresión de bombas de eflujo MDR, entre las que se incluyen diferentes transportadores ABC como ABCG2, ABCB1 o ABCG5 (Gilbert and Ross, 2009; Lobo et al., 2007). A la fracción de células con capacidad de expulsar el colorante Hoechst 33342 se la conoce comúnmente con el término inglés "side-population" (SP). Algunos estudios han demostrado que esta población celular también puede ser aislada utilizando otras sustancias como la Rodamina 123, un colorante no tóxico que, al igual que el Hoechst 33342, es eliminado del interior celular por la actividad de los transportadores ABC (Liu

et al., 2010b; Lobo et al., 2007). En diferentes tipos tumorales, incluidos tumores de mama y colon, se ha observado que la fracción de células que constituye la SP está enriquecida en células con propiedades de CSC, estando estas células implicadas en el crecimiento, la progresión y la metástasis tumoral, como demuestra su alto potencial tumorigénico al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes (Christgen et al., 2012; Haraguchi et al., 2006; Nakanishi et al., 2010; Wu and Alman, 2008). Sin embargo, algunos estudios indican que esta SP no sólo contiene células con propiedades CSC, así como que pueden existir CSC en la subpoblación celular no definida como SP (Broadley et al., 2011; Lichtenauer et al., 2008; Zhang et al., 2012a).

Otro método usado recientemente para la identificación y aislamiento de CSC es la determinación de actividades enzimáticas, como la actividad ALDH. Uno de los métodos más comúnmente utilizado para determinar esta actividad enzimática lo constituye el ensayo con el kit Aldefluor™. Este ensayo fue diseñado para determinar la actividad ALDH1, más concretamente de la isoenzima ALDH1A1, aunque recientes estudios indican que no es específico de ésta, y que también permite determinar la actividad de otras isoenzimas como la ALDH1A2 y la ALDH2 (Moreb et al., 2012). El aislamiento de la población celular dentro del tumor que muestra una alta actividad ALDH mediante FACS, ha demostrado que ésta se correlaciona con un enriquecimiento en células con propiedades de CSC en diferentes tipos tumorales como mama (Ginestier et al., 2007), colon (Huang et al., 2009), próstata (Nishida et al., 2012), pulmón (Jiang et al., 2009a), cabeza y cuello (Clay et al., 2010), así como en diversas líneas de sarcoma (Lohberger et al., 2012). Sin embargo, también se ha observado que poblaciones ALDH⁻ de cáncer de mama pueden generar micrometástasis de pulmón, lo que indica, por lo tanto, que el potencial metastásico no es exclusivo de la población ALDH⁺, y que ésta puede representar sólo una fracción de CSC (Croker et al., 2009). Además, algunos estudios indican que la estimación de la actividad ALDH puede no ser un marcador adecuado de CSC para todos los tipos tumorales (Ma and Allan, 2011).

La revisión de la bibliografía referente al aislamiento y caracterización de las CSC revela que la correcta identificación de éstas requiere un amplio estudio en el que se combinen diferentes biomarcadores. En este sentido, también suele recurrirse a la determinación de la expresión de diversas proteínas implicadas en pluripotencia y en rutas de señalización que se encuentran sobre-expresadas en estos tipos celulares.

Algunos marcadores de pluripotencia empleados en estos estudios, los cuales parecen facilitar un cambio hacia un estado indiferenciado, lo constituyen diversos ESC-TF como por ejemplo OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 y c-MYC (Patra et al., 2011; Prud'homme, 2012; Vaiopoulos et al., 2012). Respecto a las rutas de señalización implicadas en el control de la auto-renovación y diferenciación de las CSC, las principales son las rutas Wnt, Notch y Hh. La desregulación de éstas, generalmente conllevando su hiper-activación, está asociada al fenotipo CSC, por lo que diversas proteínas implicadas en estas rutas han sido propuestas como marcadores de CSC, y son actualmente estudiadas como dianas terapéuticas para el tratamiento dirigido frente a estas células malignas (Harris et al., 2012; Malhotra et al., 2011; Takebe et al., 2011).

Aunque las moléculas de superficie, las enzimas, las proteínas transportadoras y las proteínas implicadas en pluripotencia y auto-renovación se están usando para la identificación de CSC, otras pruebas más fiables las constituyen los ensayos funcionales. Dentro de éstos se incluyen ensayos *in vitro* de proliferación, capacidad para originar unidades formadoras de colonias, formación de esferas, adhesión, migración e invasión; y ensayos *in vivo* de tumorigenicidad, capacidad metastásica y habilidad para recapitular las características morfológicas del tumor original (Saini and Shoemaker, 2010). De todos estos ensayos funcionales, el más determinante lo constituye la capacidad de generar con alta frecuencia tumores xenogénicos que restablecen la heterogeneidad del tumor original en modelos animales. La capacidad tumorigénica de las CSC aisladas es generalmente ensayada mediante su inyección en ratones diabéticos con inmunodeficiencia combinada severa (NOD/SCID), aunque algunos autores proponen que estos estudios requieren modelos más severamente inmunocomprometidos, como los ratones NOD/SCID IL2R γ ^{null} que carecen de células B y T, al igual que los ratones NOD/SCID, pero que además carecen de células “natural killer” (La Porta, 2012; Shackleton et al., 2009).

7.2.2. MARCADORES ESPECÍFICOS DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS DE MAMA

Tras la demostración inicial de la existencia de CSC en tumores de tejidos hematopoyéticos (Lapidot et al., 1994), el cáncer de mama fue la primera enfermedad maligna sólida en la que fueron identificadas y aisladas estas CSC (Al-Hajj et al.,

2003). Esta primera identificación estaba basada en la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD24, siendo previamente seleccionadas las células tumorales de mama en base a la ausencia de expresión de determinados antígenos característicos de células normales que no son expresados en células cancerígenas, como CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 y CD140b; siendo consideradas estas células como Linaje⁻. Las CSC de mama (del inglés “breast cancer stem cells”, BCSC) fueron identificadas por mostrar un fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low}, ya que esta población mostraba una mayor tumorigenicidad que el resto de poblaciones seleccionadas en base a otras combinaciones de estos dos marcadores, llegando a ser incluso más de 50 veces superior a la de la población original de la masa tumoral. La población CD44⁺/CD24^{-/low} era capaz de formar tumores en ratones NOD/SCID incluso al inyectar solamente 100 células, y además estas células eran capaces de restablecer la heterogeneidad del tumor inicial. En este estudio, Al-Hajj y cols. también observaron que dentro de esta población las BCSC se caracterizaban por una alta expresión del marcador CD326 (ESA⁺) (Al-Hajj et al., 2003).

Aunque el fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low} es el más comúnmente utilizado para aislar y/o identificar BCSC de tumores humanos, algunos autores han incluido en sus estudios nuevos marcadores como: CD133, CXCR4, CD49F (Integrina- α 6), DLL1, DNER, ESA, PROCR, la actividad ALDH, la capacidad de exclusión del colorante Hoechst 33342 (SP), e incluso la capacidad de formar mamosferas o la capacidad de adhesión (Tabla 6) (Hermann et al., 2010; Hwang-Verslues et al., 2009; Lorico and Rappa, 2011; Subramaniam et al., 2010; Walia and Elble, 2010). Algunos de estos marcadores han sido utilizados en ciertos estudios en combinación con el fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low} previamente descrito por Al-Hajj. Así por ejemplo, se ha demostrado que células epiteliales aisladas de mamoplastias con actividad ALDH⁺ son capaces de crecer formando mamosferas y generar tumores en ratones NOD/SCID a partir de tan sólo 500 células. Cuando las células ALDH⁺ se enriquecieron en base al fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low} sólo 20 células fueron necesarias para generar tumores; a diferencia de las células CD44⁺/CD24^{-/low}/ALDH⁻ que tuvieron que ser inyectadas en una cantidad superior a 50.000 para generar dichos tumores (Ginestier et al., 2007). Según los resultados obtenidos en ciertos estudios, algunos autores han postulado que pueden existir diferentes subpoblaciones de BCSC caracterizadas por la expresión de diferentes marcadores, pudiendo depender su fenotipo del subtipo tumoral o del grado histológico (Al-Ejeh et al., 2011; Hwang-Verslues et al., 2009; Wright et al., 2008).

Respecto al cultivo de células tumorales de mama a modo de mamosferas, en superficies no adherentes y en condiciones de privación de suero, se ha observado que este tipo de cultivos incrementa la tumorigenicidad y la expresión de marcadores asociados al fenotipo BCSC (Rappa et al., 2008).

Tabla 6. Algunos marcadores utilizados para el aislamiento, enriquecimiento y/o identificación de células madre cancerígenas de mama (BCSC)

MARCADORES	REFERENCIA
CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}	(Al-Hajj et al., 2003)
CD133 ⁺	(Wright et al., 2008)
CD49F ⁺ /DLL ^{high} /DNER ^{high}	(Pece et al., 2010)
PROCR ⁺ /ESA ⁺	(Hwang-Verslues et al., 2009)
CD133 ⁺ /CXCR4 ⁺	(Hwang-Verslues et al., 2009)
ALDH ⁺	(Ginestier et al., 2007)
SP	(Nakanishi et al., 2010)
Capacidad de formación de mamosferas	(Rappa et al., 2008)
Baja adhesión	(Walia and Elble, 2010)

Además de estos marcadores específicos de BCSC, también se utilizan otros marcadores involucrados en la identificación de CSC de otros tipos tumorales, como por ejemplo: la expresión de proteínas transportadoras de membrana como ABCG2, también conocida como proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP); proteínas ESC-TF; y la activación de determinadas rutas de señalización (Hu and Fu, 2012; Ji et al., 2009).

Por último cabe señalar que recientes investigaciones han identificado la existencia de patrones de expresión de miRNA que son específicos en las CSC de diferentes tipos tumorales (Vira et al., 2012). En estos estudios se ha observado, por ejemplo, una baja expresión de miRNA de las familias let-7 y miR200, y una alta expresión de miembros de la familia miR146 y miR181 en BCSC (Leal and Leonart, 2012).

7.2.3. MARCADORES ESPECÍFICOS DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS DE COLON

Las CSC de colon (CCSC) fueron identificadas y aisladas por primera vez en el año 2007 por dos grupos de investigación diferentes en base a la expresión del marcador de superficie CD133 (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007), aunque anteriormente se había observado la presencia de células con características de CCSC en la fracción celular denominada SP (Haraguchi et al., 2006). En sus estudios, tanto O'Brien como Ricci-Vitiani y sus colaboradores determinaron que la capacidad de iniciar tumores en ratones inmunodeficientes NOD/SCID y de recapitular la heterogeneidad del tumor inicial estaba restringida a la subpoblación de células CD133⁺. Posteriormente en un artículo publicado ese mismo año por Dalerba y cols., se propuso el uso de una combinación de tres marcadores diferentes, CD44, CD166 (ALCAM) y CD326 (EpCAM), que permitía una mejor identificación de estas CCSC, determinándose que la subpoblación CD44⁺ constituía una pequeña fracción de células dentro de las CD133⁺ (Dalerba et al., 2007). En este último estudio se observó que la inyección de sólo 150 células con fenotipo CD44⁺/EpCAM⁺/CD166⁺ permitía la formación de tumores en ratones NOD/SCID, y que éstos reproducían la heterogeneidad morfológica y fenotípica de las lesiones originales; mientras que la subpoblación celular CD44⁻/EpCAM⁻ no era capaz de generar tumores incluso implantando 10.000 células (Dalerba et al., 2007).

En los últimos años se han ido incorporando nuevos marcadores en el estudio de las CCSC entre los que se incluyen: otros antígenos de superficie como CD24, CD26, CD29 (Integrina-β1), LGR5; la actividad ALDH; e incluso la capacidad de formar colonosferas (Tabla 7) (Kanwar et al., 2010; Vaiopoulos et al., 2012; Vermeulen et al., 2008). Respecto a la actividad enzimática ALDH, se ha demostrado que las células tumorales de colon ALDH⁺ aisladas por FACS mediante el ensayo Aldefluor, tienen la

capacidad de formar tumores en ratones NOD/SCID con la implantación de tan sólo 25 células, recapitulando éstos el fenotipo histológico del tumor original (Huang et al., 2009). Por otro lado, también se ha observado un enriquecimiento de células que expresan marcadores de CCSC en cultivos de colonosferas (Kanwar et al., 2010). Además, otros marcadores superficiales como CEACAM5, Cadherina17 o Biglicano, se han asociado a poblaciones celulares CD133⁺ de cáncer de colon, por lo que también han sido propuestos como posibles marcadores para la identificación de CCSC (Fang et al., 2010).

Tabla 7. Algunos marcadores utilizados en el aislamiento, enriquecimiento y/o identificación de células madre cancerígenas de colon (CCSC)

MARCADORES	REFERENCIA
CD133 ⁺	(O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007)
CD44 ⁺ /CD166 ⁺ /EpCAM ⁺	(Dalerba et al., 2007)
CD44 ⁺ /CD24 ⁺	(Yeung et al., 2010)
CD24 ⁺ /CD29 ⁺	(Vermeulen et al., 2008)
CD26 ⁺	(Pang et al., 2010)
LGR5 ⁺	(Takahashi et al., 2011)
ALDH ⁺	(Huang et al., 2009)
SP	(Haraguchi et al., 2006)
Capacidad de formación de colonosferas	(Kanwar et al., 2010)

Aparte de éstos, otros marcadores también utilizados en la identificación de CCSC son: i) diversas proteínas relacionadas con el mantenimiento del estado indiferenciado, como MSI1; ii) proteínas transportadoras de membrana, como ABCC1 o ABCG2; iii) la actividad de determinadas rutas de señalización como la WNT/ β -

catenina; iv) la expresión de ESC-TF; v) o la expresión de proteínas reguladoras de la proliferación y diferenciación celular, entre las que se incluyen BMI1 y CDX2 (Fang et al., 2010; Vaiopoulos et al., 2012).

Por otro lado, también se ha observado una correlación entre la expresión de determinados miRNA y el fenotipo CCSC (Vira et al., 2012). En este sentido, recientes estudios indican que estas células muestran una baja expresión de determinados miRNA, especialmente de miR451 y miR93. Respecto a estos miRNA, se ha observado que la expresión ectópica de miR451 en CCSC disminuye su capacidad de auto-renovación, su tumorigenicidad y su quimioresistencia a ciertos fármacos; mientras que la sobre-expresión de miR93 inhibe la proliferación celular y la capacidad de formación de colonias por parte de las CCSC (Leal and Leonart, 2012).

7.3. VALOR PRONÓSTICO

El descubrimiento de las CSC ha abierto un nuevo camino en el estudio del cáncer, debido al papel crucial que éstas juegan en la iniciación y propagación del tumor, la resistencia a los tratamientos convencionales, la diseminación metastásica y la recurrencia. Es por ello que la identificación y determinación de la presencia de CSC en los pacientes es de gran interés a la hora de valorar el pronóstico y predecir la evolución clínica de la enfermedad (Bhattacharyya and Khanduja, 2010; Cheng et al., 2011). En este sentido, se ha observado que la presencia únicamente de células maduras aberrantemente diferenciadas en las masas tumorales residuales después de proceder con el tratamiento antitumoral es un factor pronóstico favorable. Sin embargo, la presencia de células residuales indiferenciadas predice la recurrencia de la enfermedad (Magee et al., 2012). Además, se ha determinado que existe una relación directa entre un menor grado de diferenciación de las células tumorales y una mayor agresividad del tumor (Sobin et al., 2010).

Estudios recientes indican que la presencia de células tumorales de fenotipo asociado a BCSC se correlaciona con un peor pronóstico en los pacientes con cáncer de mama. Así por ejemplo, un meta-análisis, basado en diferentes estudios publicados previamente, determinó que la presencia de subpoblaciones ALDH⁺ estaba asociada a fenotipos biológicamente agresivos de alto grado histológico, principalmente a cánceres de mama del subtipo denominado de tipo basal. En este estudio también se

observó que la presencia de células CD44⁺/CD24^{-/low} estaba asociada significativamente con una peor supervivencia global a la enfermedad (Zhou et al., 2010). Además, algunos estudios indican que los cánceres de mama triple negativos, entre los que se incluyen el subtipo de tipo basal y el denominado de baja claudina, son los más agresivos y tienen un peor pronóstico, mostrando una mayor incidencia de metástasis distal y recurrencia que ha sido asociada a un alto contenido en células de fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low} (Idowu et al., 2012; Prat and Perou, 2011).

En cáncer de colon, la expresión de diferentes marcadores de CCSC han sido propuestos como posibles marcadores de un pronóstico desfavorable (Vaiopoulos et al., 2012). Uno de los principales marcadores estudiados es CD133, habiéndose observado que su expresión tiene un alto valor pronóstico para evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad, de metástasis y de mortalidad de los pacientes (Horst et al., 2009). También se ha correlacionado la expresión de otros marcadores identificados en CCSC, como LGR5, CD44, CD166, EpCAM o ABCG5, con una mayor recurrencia y una menor tasa de supervivencia (Hostettler et al., 2010; Saigusa et al., 2012; Weichert et al., 2004). Aparte de los antígenos superficiales, otras proteínas expresadas en CCSC también pueden tener un valor pronóstico. Así por ejemplo, se ha determinado que la expresión de ESC-TF puede servir como marcador pronóstico en cáncer de colon. En este sentido, su expresión ha sido asociada con un mal pronóstico de la enfermedad, la recaída y la recurrencia distante, así como con la resistencia a la quimioterapia y radioterapia convencionales (Vaiopoulos et al., 2012).

Aunque se ha relacionado la expresión de determinados marcadores asociados a CSC y un peor pronóstico de la enfermedad en diferentes tipos tumorales, cabe destacar que diversos estudios han puesto de manifiesto que pueden existir diferencias en el fenotipo de las CSC de un mismo tipo tumoral en función del subtipo y el estado histológico. Esto hace pensar que puedan existir diferentes subpoblaciones de CSC dentro de un mismo tipo tumoral debido principalmente a la heterogeneidad intertumoral existente (Al-Ejeh et al., 2011). Es por ello que, dada la heterogeneidad evidente entre los pacientes y la dependencia del contexto en la expresión de algunos marcadores actualmente utilizados, se hace necesario identificar nuevos marcadores de CSC. Además de la utilización de marcadores de CSC, se requiere la confirmación del fenotipo CSC mediante ensayos funcionales para cada paciente y en cada circunstancia experimental en los que se utilizan (Magee et al., 2012).

7.4. TERAPIAS SELECTIVAS FRENTE A LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

Varios estudios han demostrado la mayor resistencia de las CSC respecto al resto de células tumorales a las terapias antitumorales convencionales, por lo que estos tratamientos suelen conllevar el enriquecimiento del tumor en CSC (Economopoulou et al., 2012). La radioterapia y la quimioterapia constituyen las principales estrategias utilizadas para el tratamiento del cáncer. La radioterapia consiste en el empleo de radiaciones de alta energía, bien a través de la irradiación desde una fuente externa con rayos-X, rayos- γ , o haces de electrones o protones; o a través de la introducción de una fuente radiactiva en el paciente, lo que se conoce como braquiterapia. Por otro lado, la quimioterapia se basa en la utilización de fármacos citotóxicos que actúan en diferentes fases del ciclo celular (Tobias et al., 2010). Un agente quimioterapéutico muy utilizado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de mama, es el Paclitaxel. Este alcaloide vegetal del grupo de los taxanos se comenzó a aplicar clínicamente en 1992, y ejerce su efecto citotóxico mediante el arresto del ciclo celular en la fase G2/M. El Paclitaxel se une a la β -tubulina, promoviendo su polimerización, estabilizando los microtúbulos y perturbando la dinámica de éstos, lo que interfiere con la degradación normal de los microtúbulos durante la división celular, y conduce finalmente a la apoptosis (Yue et al., 2010). En el ámbito clínico, la radioterapia se usa comúnmente con intención curativa, mientras que la quimioterapia se emplea principalmente en el contexto paliativo y adyuvante. Una estrategia muy utilizada consiste en la combinación de ambos tratamientos, lo que se denomina como quimio-radioterapia, ya que se ha demostrado que esta estrategia es más eficaz para lograr la respuesta local completa de la quimioterapia (Brunner et al., 2012).

Diferentes mecanismos están implicados en la resistencia de las CSC a la radioterapia y quimioterapia, entre ellos se incluyen: i) *una alta expresión de secuestradores de radicales libres*, responsables de la drástica disminución de los radicales libres formados tras la irradiación, lo que conduce a un número reducido de roturas de DNA de doble cadena (Lagadec et al., 2012); ii) *la alteración de puntos de control del ciclo celular*, habiéndose observado que la activación de éstos a través de la expresión de diferentes quinasas, como ATM, CHK1 o CHK2, tiene un efecto protector frente a quimioterapia y radioterapia, ya que incrementan la capacidad de reparación del DNA (Bao et al., 2006; Bartucci et al., 2012); iii) *la desregulación de*

rutas apoptóticas, por ejemplo mediante la producción de IL-4 (Todaro et al., 2007), ya que la muerte celular por quimioterapia y radioterapia se produce generalmente a través de la inducción de la apoptosis (Plati et al., 2011); iv) *la expresión de transportadores ABC*, que participan activamente en la eliminación del interior celular de agentes quimioterapéuticos, así como de radiofármacos y radiosensibilizadores (Brunner et al., 2012); v) *la expresión de enzimas detoxificantes*, como la ALDH que protege a las células de la acción de diferentes fármacos como la ciclofosfamida, y que en un estudio reciente también se ha asociado con la resistencia a radioterapia (Crocker and Allan, 2012); vi) o *la quiescencia*, ya que la entrada en un estado de dormancia confiere a estas células protección frente a la mayoría de terapias antitumorales convencionales (Li and Bhatia, 2011), puesto que éstas suelen ir dirigidas a células en división (Vogel et al., 2007).

Los datos anteriormente mostrados tienen importantes implicaciones terapéuticas, y es por ello que en los últimos años muchos investigadores han centrado sus estudios en el desarrollo de terapias dirigidas a erradicar estas CSC. Las dianas terapéuticas escogidas para el desarrollo de tratamientos frente a CSC son muy variadas, y entre ellas se incluyen: i) *marcadores de la superficie celular*, como CD44 o las integrinas; ii) *rutas de señalización implicadas en auto-renovación*, como Wnt, Notch o Hh; iii) *citoquinas y vías implicadas en procesos inflamatorios*, como IL-6, IL-8 o NF- κ B; iv) *mecanismos asociados a la EMT*, como la ruta de señalización TGF- β ; v) *moléculas implicadas en la metástasis*, principalmente CXCR4 y su ligando SDF-1; vi) *factores de crecimiento, así como sus receptores y co-receptores*, tales como la neuropilina-1 que es co-receptor del VEGF; vii) *componentes de señalización*, como las tirosina quinasas (Prud'homme, 2012); viii) *proteínas implicadas en el control mitótico*, como BUB o MAD (Wang et al., 2008); ix) *proteínas que confieren protección frente a la apoptosis*, como IL-4 (Catalano et al., 2011); x) *transportadores de membrana*, tales como diversas proteínas de la familia ABC (Gatti et al., 2011); xi) o *enzimas detoxificantes*, como la ALDH (Visus et al., 2011).

Actualmente están siendo desarrolladas múltiples estrategias terapéuticas frente a estas células tumorales. Algunas de las moléculas y mecanismos utilizados en estos estudios son, por ejemplo: i) *compuestos naturales*, como la salinomicina, que actúa como inhibidor de transportadores ABC, haciendo a éstas células más sensibles a las terapias convencionales, o el sulforafano, que tiene un efecto citotóxico frente a

CSC (Hu and Fu, 2012); ii) *compuestos sintéticos*, como algunas moléculas desarrolladas que actúan a modo de inhibidores de determinadas rutas de señalización, como la Hh (Takebe et al., 2011); iii) *inductores de la diferenciación*, entre los que se incluyen diferentes agentes diferenciadores, como el vorinostat, o productos génicos de ciertas rutas de señalización, como la Wnt o Hh (Hu and Fu, 2012; Roy et al., 2010b); iv) *anticuerpos*, que reconocen específicamente diferentes proteínas celulares expresadas en CSC, y que pueden ser utilizados para estimular la respuesta inmune, bloquear vías de señalización, inhibir la función de determinadas proteínas, o incluso para la administración de agentes citotóxicos (Deonarain et al., 2009; Okamoto and Perez, 2008); v) *miRNA*, como miRNA supresores de tumores que pueden ser expresados ectópicamente (Leal and Leonart, 2012); vi) *células inmunes*, por ejemplo mediante la generación de células T CD8+ específicas frente a células con altos niveles de ALDH1A1 para su utilización en inmunoterapia (Visus et al., 2011); vii) *MSC*, que pueden ser empleadas como vehículos para la entrega de genes o proteínas terapéuticas (Hu and Fu, 2012); viii) o *nanopartículas*, desarrolladas para mejorar la terapia dirigida frente a CSC, así como para controlar la administración y liberación de fármacos (Vinogradov and Wei, 2012).

Una de las estrategias terapéuticas más utilizadas frente a las CSC, consiste en la utilización de inhibidores de rutas de señalización implicadas en la auto-renovación celular, y que se encuentran desreguladas en las CSC. La inhibición de la ruta WNT/ β -catenina puede realizarse a diferentes niveles. Una estrategia consiste en impedir la activación de la ruta a través de inhibidores de porcupine, una molécula que es requerida para el procesamiento y secreción de proteínas WNT. Otra mediante el bloqueo de la unión de las proteínas WNT a sus receptores Frizzled, bien utilizando anticuerpos que reconocen específicamente estas proteínas, o mediante el uso de inhibidores de la unión ligando receptor, como el factor-1 inhibidor de WNT (WIF-1) o las proteínas DKK. Una opción diferente puede ser la de favorecer la degradación de la β -catenina citoplasmática, por ejemplo mediante la utilización de agentes estabilizadores de la Axina, una proteína que forma parte del complejo multiproteico de destrucción de la β -catenina; o favorecer la translocación de la β -catenina desde el núcleo al citoplasma, mediante el uso de tiazolidinediona. Otra posibilidad consiste en impedir la transcripción génica, por ejemplo utilizando sustancias que compiten en la interacción β -catenina /TCF, como las vitaminas A y D y sus derivados; mediante el uso de inhibidores de la transcripción de genes dianas específicos, como NSAID; o a

través del uso de agentes que promueven la degradación de TCF, entre los que se incluye el celecoxib (Figura 20) (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011).

En lo que respecta a la inhibición de la ruta Notch, la principal estrategia terapéutica utilizada consiste en inhibir la actividad de la enzima γ -secretasa, que produce la escisión de NICD (Takebe et al., 2011). Uno de estos inhibidores de la γ -secretasa (GSI) es el N-[N-(3,5-Difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT). Este compuesto, así como otros GSI, evita la liberación de NICD al citoplasma y, por lo tanto, su translocación al núcleo, impidiendo la expresión de genes diana de esta ruta (Yu et al., 2011; Zhou et al., 2012). Aparte de esta estrategia terapéutica, la inhibición de la ruta Notch también puede llevarse a cabo mediante el bloqueo de la unión ligando-receptor, bien utilizando anticuerpos específicos frente a ligandos como el DLL4, o inactivando los receptores NOTCH, por ejemplo utilizando secuestradores de receptores NOTCH solubles. Además, actualmente se están desarrollando inhibidores de MAML1 que impiden la formación del complejo MAML/CSL/NOTCH, el cual forma parte del complejo transcripcional NOTCH (Figura 21) (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011).

Por otra parte, uno de los principales inhibidores de la ruta Hh es la ciclopamina, un alcaloide esteroideo derivado de las plantas, que se une a receptores SMO y los desactiva. Aparte de este compuesto natural, han sido sintetizadas diversas moléculas con un mayor poder de inhibición de estos receptores, entre las que se encuentran diversos antagonistas de SMO (SANT) con propiedades similares a fármacos, como Cur-61414 o IPI-926. Otra molécula empleada en la inhibición de esta ruta es la robotnikinin, la cual se une al ligando SHh. También han sido desarrolladas diversas moléculas sintéticas, denominadas como inhibidores de proteínas Hh (HPI), entre las que se incluyen HPI-1, que inhibe la activación de GLI1/2; HPI-2 y HPI-3, que inhiben la activación de GLI2; y HPI-4, que inhibe la formación de los cilios evitando la activación de SMO y por lo tanto, de los factores de transcripción GLI (Figura 22) (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011).

HYPOTHESIS

The discovery and recent advances in SC biology have led to the development of stem cell therapy, a branch of regenerative medicine, which is based on the use of SC potential for therapies aimed to facilitate the repair of degenerating or injured tissues (Piscaglia, 2008).

To date, regenerative cell therapy to treat cardiovascular diseases has been focused on the use of autologous SC from patients, mainly blood-derived EPC or bone marrow-derived SC. These two cell populations have demonstrated a remarkable ability to improve myocardial perfusion and contractile function and enhance limb perfusion in clinical trials (Matoba et al., 2008; Pasquet et al., 2009; Taljaard et al., 2010; Trachtenberg et al., 2011). However, there are still some drawbacks for their clinical utility such as the extremely low number of EPC in the bloodstream and the low availability and harvesting difficulties of bone marrow-derived SC (Asahara et al., 2011; Behr et al., 2010). Furthermore, the background factors in clinical patients such as aging, diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and smoking, which may reduce the number and biological activity of bone marrow-derived SC and circulating EPC, represent possible major limitations for the success primary transplantations of these cells (Alt et al., 2012; Asahara et al., 2011; Neef et al., 2012).

In contrast, hASC can be isolated in a greater number, up to billions of cells, through a safe non-invasive routinely liposuction procedure under local anesthesia. These hASC can also be expanded in culture and differentiate into different cell types, including endothelial cells, in a controllable and reproducible manner, and can be safely and effectively transplanted into an autologous or allogeneic host (Behr et al., 2010; Iwashima et al., 2009). Therefore, hASC might be a promising source of progenitor cells that could be used for regeneration of vascular and/or heart lesions.

SC are long-lived cells with distinctive properties of self-renewal and has the potential to proliferate extensively. Given these features, it is possible that they may accumulate consecutive mutations, which are crucial for malignant transformation and tumour initiation (Kucia and Ratajczak, 2006). Moreover, the oncogenic process could be more efficient in this cell population due to their intrinsic machinery in the regulation of self-renewal, quiescence and resistance to insults. Hence, the oncoprotein does not have to create such mechanisms because they are already in place (Ghaffari, 2011). In this sense, there are a number of studies that show that CSC can be generated by

oncogenic transformation of SC progeny; and that some SC types, such as ESC and iPS, tend to form teratomas and have a high risk of malignant transformation (Ben-David and Benvenisty, 2011; Chen et al., 2012a; Ghaffari, 2011). Therefore, 'stemness' might be seen as a two-edged sword, its bright side being represented by normal SC, its dark side by tumoral SC (Piscaglia, 2008).

Since the first identification of CSC in the human acute myeloid leukemia (Lapidot et al., 1994), many studies have been published demonstrating the existence of a cellular subset within the tumour that have the ability to guide cancer propagation in different solid tumours, including breast and colon cancers (Hermann et al., 2010; O'Brien et al., 2009). CSC are characterized by tumorigenic properties and the ability to self-renew, they form differentiated progeny, and develop chemo-resistance and radio-resistance that lead to the failure of traditional therapies. Thus, the eradication of CSC, which are the root of cancer origin and recurrence, it is now considered as a promising approach to improve cancer survival or even to cure cancer patients (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011). Immortalized cell lines are a good model to study cancer biology since they represent polyclonal cell populations adapted to tissue culture conditions but retain many of their phenotypic and genotypic properties over countless passages. Moreover, they contain analogous hierarchical differentiation programs to those found in primary tumours. Therefore cancer cell lines are nowadays used to establish techniques that can facilitate the characterization of CSC regulatory pathways and to identify potential SC markers and possible therapeutic targets (Charafe-Jauffret et al., 2009; Fillmore and Kuperwasser, 2008).

Different strategies for the isolation and characterization of CSC have been recently developed. These approaches are based on specific characteristics of this cell population, such as the expression of particular cell surface markers, the ability to efflux the fluorescent dye Hoechst 33342, their high ALDH activity, their capacity to form floating spheres, and even their different adhesion capability (Hermann et al., 2010; Lorico and Rappa, 2011; Vaiopoulos et al., 2012; Vira et al., 2012; Walia and Elble, 2010).

The identification and characterization of cell surface markers present on different types of tumours have shown a wild heterogeneity. In breast cancer, for instance, low or negative expression of CD24 has been broadly used as characteristic

of BCSC, however the relationship between CD24 surface expression and stemness differs among solid tumours (Hermann et al., 2010; O'Brien et al., 2009). It has been shown that CD44⁺/CD24^{-/low} breast cancer subpopulations are enriched for CSC (Al-Hajj et al., 2003), but the relative contributions of CD44⁺/CD24 negative versus low subpopulations are poorly defined.

Microenvironment plays a crucial role in tumorigenesis and cancer progression. In this sense it has been observed that obesity or a high body mass index is associated with increased risk of more aggressive breast cancer (Carmichael, 2006; Majed et al., 2008). Adipocytes in obese tissues upregulate chemokines and leptins that in turn, attract inflammatory macrophages to produce pro-inflammatory proteins and pro-angiogenic factors providing a microenvironment favorable to tumor growth (Campbell et al., 2011; Zeyda et al., 2010). Since paracrine activation of cytokine pathways can promote oncogenic proliferation (Bromberg and Wang, 2009; Cabodi and Taverna, 2010), the cytokine milieu of the breast adipose tissue may contribute to mammary tumorigenesis and/or progression. In regard to pro-angiogenic factors, it is well known that VEGF play a key role in tumoral angiogenesis (George et al., 2011). In addition, VEGF was recently reported to stimulate squamous cell skin carcinoma CSC, suggesting that VEGF not only creates a perivascular niche for CSC, but may also promotes their expansion (Beck et al., 2011).

Regarding to the therapeutic implications of CSC, it has been demonstrated that functional differences between tumorigenic and non-tumorigenic cells influence response to therapy and prognosis (Magee et al., 2012). CSC possess different mechanisms that confer them chemoresistance to conventional anti-cancer therapies, such as: high expression levels of free radical scavengers, activation of cell cycle checkpoints, dysregulation of apoptotic pathways, over-expression of MDR proteins and detoxification enzymes or quiescence (Bao et al., 2006; Bartucci et al., 2012; Brunner et al., 2012; Croker and Allan, 2012; Lagadec et al., 2012; Li and Bhatia, 2011; Todaro et al., 2007). These findings and the advances in CSC biology have led to the study of new therapies directed against CSC. One approach consists in the inhibition of specific cell signaling pathways that are deregulated in CSC. In this sense, inhibition of γ -secretase has been proved effective as a Notch pathway target therapy. Actually, several pharmaceutical companies have developed GSI that are in the early clinical development (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011).

In order to address these issues we propose the following hypothesis:

1. Since hASC can be expanded in culture and differentiate into different cell types, including endothelial cells, we think that it is possible to develop a new approach to easily derive large number of multipotent endothelial-like cells (ME-LC) from human adipose tissue with the capacity to display endothelial and cardiomyocytes-like properties in culture.

2. Several methodologies have to be combined to isolate and characterize all different CSC populations from breast and colon cancer.

3. Since CD24 surface marker and stemness differs among solid tumours, we hypothesized that only one of the subpopulations, CD44⁺/CD24^{neg} or CD44⁺/CD24^{low+}, are associated with breast cancer stem cells properties.

4. Several microenvironmental factors, that are present in pathological conditions, such as cytokines secreted by tumour-associated cells or VEGF production, may play an important role in the acquisition of CSC properties.

5. The knowledge about CSC properties has important therapeutic implications. Therefore, conventional chemotherapy-based treatment of cancer differs from targeted therapies against CSC.

OBJECTIVES

The objectives proposed in this research are summarized below:

MAIN OBJECTIVE:

- To establish methods of isolation and enrichment of normal and tumor SC populations, and determine their importance both in cardiovascular regeneration processes and in tumor development.

SECONDARY OBJECTIVES:

- To isolate and characterize hASC from adipose tissue samples obtained by liposuction.

- To obtain and maintain in culture for long periods endothelial lineage progenitor cells from cultures of hASC.

- To characterize phenotypically and functionally these progenitor cells.

- To demonstrate their endothelial and cardiac differentiation ability.

- To test different methodologies to isolate and enrich CSC subpopulations from human colon and breast cancer cell lines.

- To characterize phenotypically and functionally these CSC *in vitro* and *in vivo*.

- To determine the role of different pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines in the acquisition of stem cell-like properties.

- To study the effect of therapy based in Paclitaxel on different BCSC subpopulations.

- To analyze the therapeutic potential of selective inhibition of the Notch signaling pathway in BCSC.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. LÍNEAS CELULARES

Como modelo de células endoteliales para los estudios de vasculogénesis *in vitro*, fue seleccionada una línea celular procedente de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humana (del inglés “human umbilical vein endotelial cells”, HUVEC), en concreto una línea establecida a partir de éstas denominada HUV-EC-C (referencia ATCC nº CRL-1730).

Para los estudios con células tumorales, fueron seleccionadas: la línea T-84 (referencia ATCC nº CCL-248), derivada de una metástasis de pulmón de un carcinoma de colon de un varón de 72 años de edad; la línea HT-29 (referencia ATCC nº HTB-38), derivada de un adenocarcinoma colorrectal de una mujer de 44 años; la línea MDA-MB-231 (referencia ATCC nº HTB-26), derivada de un adenocarcinoma de mama procedente de una mujer de 51 años, que se caracteriza por ser una línea triple negativa, es decir, ER⁻/PR⁻/HER2⁻; y la línea MCF-7 (referencia ATCC nº HTB-22), derivada de un adenocarcinoma de mama de una mujer de 69 años, siendo caracterizada molecularmente esta línea celular por ser ER⁺/PR⁺/HER2⁻.

Todas las líneas celulares fueron obtenidas a través del servicio de cultivos celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

1.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Las células fueron cultivadas generalmente en frascos de cultivo de 75 cm² (Nunc, Rochester, NY, EEUU), en un incubador de CO₂ (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EEUU) a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad.

Tanto para el cultivo de las líneas celulares tumorales como para el cultivo primario de las hASC obtenidas de muestras frescas de lipoaspirados humanos (ver protocolo detallado en el apartado 2.1.), se empleó como medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU)

suplementado con 1% de una solución stock de penicilina y estreptomicina que contiene 10.000 U/mL de penicilina-G y 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), y 10% de suero fetal bovino (FBS) (BioWhittaker, Lonza, Basel, Switzerland), inactivado previamente por calor húmedo a 56°C durante 30 min, siendo denominado este medio de cultivo como “DMEM-FBS”.

Para el cultivo de las células HUVEC el medio utilizado fue el denominado “EGM-2”, compuesto por EBM-2 (del inglés “endothelial basal médium-2”) (Clonetics, Lonza, Wokingham, UK) conteniendo 2% de FBS y suplementado con VEGF, FGF, EGF, factor de crecimiento tipo insulina I (R3-IGF-1), hidrocortisona, ácido ascórbico, gentamicina sulfato y anfotericina-B (Clonetics, Lonza, Wokingham, UK).

Una vez preparados los medios de cultivo, fueron esterilizados empleando filtros de 0,22 µm de diámetro (Millipore, France) en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar vertical (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments) y conservados en frascos de cultivo estériles a 4°C por un periodo no superior a un mes, ya que algunos de los reactivos añadidos a los medios pueden perder sus propiedades biológicas al ser conservados durante periodos más largos. En algunos casos, ciertos suplementos fueron añadidos inmediatamente previos a la utilización de determinados medios de cultivo, ya que su actividad puede verse reducida tras varias horas.

El medio de cultivo se renovó regularmente cada 48-72 h aproximadamente, con el fin de evitar la acumulación de metabolitos dañinos para las células y la variación del pH, siendo ésta detectada gracias a la presencia de un indicador de pH, el rojo fenol, que vira de color al producirse la acidificación o basificación del medio. El procedimiento empleado para los cambios de medio consistió en la retirada del mismo, seguido de un lavado del frasco de cultivo con Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) y posteriormente la adición de medio de cultivo nuevo previamente atemperado a 37°C en un baño.

Cuando el cultivo alcanzaba aproximadamente un 90% de confluencia celular se realizaba la división del mismo. Para ello, se procedió a la retirada del medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS para eliminar los restos de suero, ya que éste inhibe la actividad de la tripsina que se requiere para la separación de las células adheridas a la superficie del frasco de cultivo. Tras los lavados se procedió a la adición

de 1 mL de Tripsina-EDTA (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) previamente atemperada a 37°C, y se incubaron las células en la estufa de cultivo a 37°C durante aproximadamente 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se comprobó en el microscopio la separación de las células, apareciendo éstas con morfología redondeada, refringentes y en suspensión, procediendo en este momento a la inactivación de la acción enzimática de la tripsina mediante la adición de medio de cultivo con suero (DMEM-FBS). Las células en suspensión fueron traspasadas a un tubo de polipropileno de 50 mL y centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 min, siendo posteriormente descartado el sobrenadante y resuspendido el pellet de células en el medio de cultivo adecuado, en función del tipo celular. Por último, se procedió al conteo de células y a la siembra de las mismas en nuevos frascos de cultivo de 75 cm² a una densidad de 3 x 10⁶ céls /frasco.

Los cambios de medio y los pases de los cultivos siempre fueron realizados en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar y utilizando materiales y soluciones estériles previamente atemperadas a 37°C. Para la separación de fases en gradiente de densidad fue empleada una centrífuga (Centrifuge 5810R, Eppendorf Corp., Hamburg, Germany).

1.3. CONTEO CELULAR

Para la estimación del número de células presentes en suspensión en un determinado medio líquido, se utilizó una cámara de Neubauer (Zuzi Corp., France) y un microscopio óptico Nikon, modelo HF X-IIA (Nikon Corp., Japan).

La estimación del número de células se realizó tomando 100 µL de células en suspensión, previamente resuspendidas con ayuda de una pipeta para permitir una distribución homogénea de células en toda la solución, y se traspasaron a un eppendorf de 0,5 mL (Eppendorf Corp., Hamburg, Germany), donde se realizó una dilución 1:2 añadiendo 100 µL de una solución de trypan blue (TB) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) diluido en agua destilada a una concentración del 0,4%. El uso del TB permite determinar la viabilidad celular, ya que las células muertas que aparezcan en la muestra tiñen su citoplasma de azul al introducirse el TB a través de su membrana degradada. De esta dilución se cogieron 10 µL que fueron cargados en la cámara de Neubauer, colocando previamente sobre ésta un cubreobjetos.

Una vez cargada la muestra, la cámara se colocó en el microscopio óptico, donde fueron contadas las células viables que aparecían en los cuadrantes delimitados en la cámara de Neubauer; se estimó la media y el valor resultante se multiplicó por el factor de dilución aplicado ($\times 2$) y el factor de la cámara ($\times 10.000$) para obtener el número de células por mililitro presente en la solución inicial. Para conocer el número total de células en la suspensión celular inicial sólo se requiere multiplicar el valor obtenido por el volumen total conocido de la suspensión celular.

1.4. CONGELACIÓN CELULAR

Para el almacenamiento de los cultivos celulares se procedió a la congelación de los mismos. Primeramente las células fueron despegadas del frasco de cultivo de forma similar a la descrita anteriormente, siendo retirado el medio de cultivo, realizando 2 lavados con PBS y se incubaron durante 5 min a 37°C con Tripsina-EDTA. Tras la inactivación de la tripsina con DMEM-FBS las células en suspensión fueron traspasadas del frasco de cultivo a un tubo de 50 mL y se realizó una centrifugación a 1.500 rpm durante 5 min, obteniendo un pellet de células que, tras desechar el sobrenadante, fue resuspendido a una concentración de 5×10^5 céls/mL en un medio denominado "Medio de Congelación", compuesto por FBS previamente inactivado, y dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) al 10%. El DMSO es utilizado para la criopreservación celular ya que es un solvente bipolar hidrosoluble que difunde fácilmente hacia el interior celular, evitando el acúmulo de electrolitos, así como la formación de cristales de hielo que, en caso de originarse, producirían daños en la membrana celular así como de otros componentes intracitoplasmáticos.

Para el almacenaje de los cultivos celulares a corto plazo, las células resuspendidas en Medio de Congelación a una concentración de 5×10^5 céls/mL fueron traspasadas a criotubos (Nunc, Rochester, NY, EEUU) a razón de 1 mL por criotubo y se procedió a la congelación inmediata mediante su colocación a -80°C , ya que el DMSO es un agente altamente citotóxico a temperatura ambiente. Para el almacenaje a largo plazo, los cultivos celulares depositados en criotubos sufrieron una congelación progresiva hasta su almacenaje definitivo en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C .

1.5. DESCONGELACIÓN CELULAR

La descongelación de los cultivos celulares almacenados en criotubos se realizó siguiendo diferente metodología en función de la temperatura de congelación. Así pues, las células almacenadas a -80°C fueron descongeladas por calor húmedo a 37°C , colocando inmediatamente los criotubos en un baño, mientras que aquellas conservadas en nitrógeno líquido a -196°C fueron descongeladas gradualmente siguiendo el patrón de descongelación adecuado. Una vez descongeladas, las células fueron lavadas 2 veces con PBS para eliminar los restos de DMSO y posteriormente el pellet de células obtenido fue resuspendido en medio de cultivo previamente atemperado a 37°C , trabajando en todo momento en condiciones de esterilidad. Tras esto, se procedió al conteo celular y a la siembra de las células en frascos de cultivo con filtro de 75 cm^2 de superficie a una densidad de 3×10^6 céls /frasco.

2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE / PROGENITORAS

2.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSEO

Las hASC fueron obtenidas a partir del tejido adiposo subcutáneo procedente de individuos que fueron sometidos a liposucción en el Hospital Nuestra Señora de la Salud de Granada, previa firma del consentimiento informado de todos los pacientes y la aprobación del Comité de Ética del centro hospitalario, gracias a la colaboración de la Dra. Carmen Huertas del Servicio de Cirugía Plástica, ajustándose este estudio a los principios descritos en la Declaración de Helsinki. La obtención de los lipoaspirados fue realizada siguiendo el procedimiento mínimamente invasivo estandarizado para este tipo de intervenciones. En el proceso se introduce a través de la piel del paciente una fina cánula hasta las bolsas de grasa, quedando dicha cánula conectada a una máquina que produce un efecto de vacío. Durante el proceso se realizan movimientos de la cánula para disgregar el tejido que es posteriormente succionado hasta ser recolectado en unos recipientes estériles especiales.

Las muestras de tejido graso humano fueron depositadas en tubos de polipropileno de 50 mL estériles, en condiciones de asepsia, y lavados 4 veces con PBS en proporción 1:1 para eliminar, en la medida de lo posible, la sangre presente en

la muestra, realizando centrifugaciones de 7 min a 300 G para separar la fase grasa que fue recuperada y depositada en nuevos tubos de 50 mL mediante la utilización de pipetas Pasteur de plástico. Las células fueron posteriormente disgregadas enzimáticamente con una solución de Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) conteniendo 1 g/L de Colagenasa tipo I A y 1% de suero de albúmina bovina (BSA) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), añadiendo dicha solución en proporción 1:1 e incubando durante 60 min a 37°C y agitación suave.

La suspensión celular obtenida tras la digestión fue centrifugada durante 7 min a 300 G, y posteriormente fue descartado el sobrenadante y resuspendido el pellet en 7 mL de solución de lisis, Ammonium Chloride Solution (StemCell Technologies, Tukwila, WA, EEUU), conteniendo NH₄Cl a una concentración 160 mM, incubando 10 min a 4°C para lisar los eritrocitos que pudieran quedar aún en la muestra. Por último, las células en suspensión fueron centrifugadas durante 7 min a 300 G, fue descartado el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 10mL de medio de cultivo DMEM-FBS. Las células fueron contadas y sembradas en frascos de cultivo celular con filtro de 75 cm² de superficie a una densidad de 2 x 10³ céls/cm².

2.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MULTIPOTENTES DE TIPO ENDOTELIAL

Las hASC sembradas en frascos de cultivo con filtro de 75 cm² de superficie a una densidad de 3 x 10⁶ céls /frasco fueron cultivadas en medio DMEM-FBS a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad (Etapa I) (Figura 23). Transcurridas 2 semanas, el medio de cultivo fue reemplazado por medio libre de suero compuesto únicamente de DMEM suplementado con una solución de penicilina y estreptomicina al 1%, al que se denominó medio "DMEM", para inducir el desarrollo de agregados multicelulares que fueron denominados como "sphere cluster formations" (SCF) (Etapa II) (Figura 23).

Tras cultivar las células en ausencia de suero, en las mismas condiciones indicadas anteriormente, durante 3 semanas, las SCF formadas fueron despegadas mecánicamente con la ayuda de un scraper (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) (Figura 23), y sembradas en placas de 6 pocillos (Corning Inc., Corning, NY, EEUU) a una concentración de 10-15 SCF por pocillo, primeramente en medio DMEM-FBS

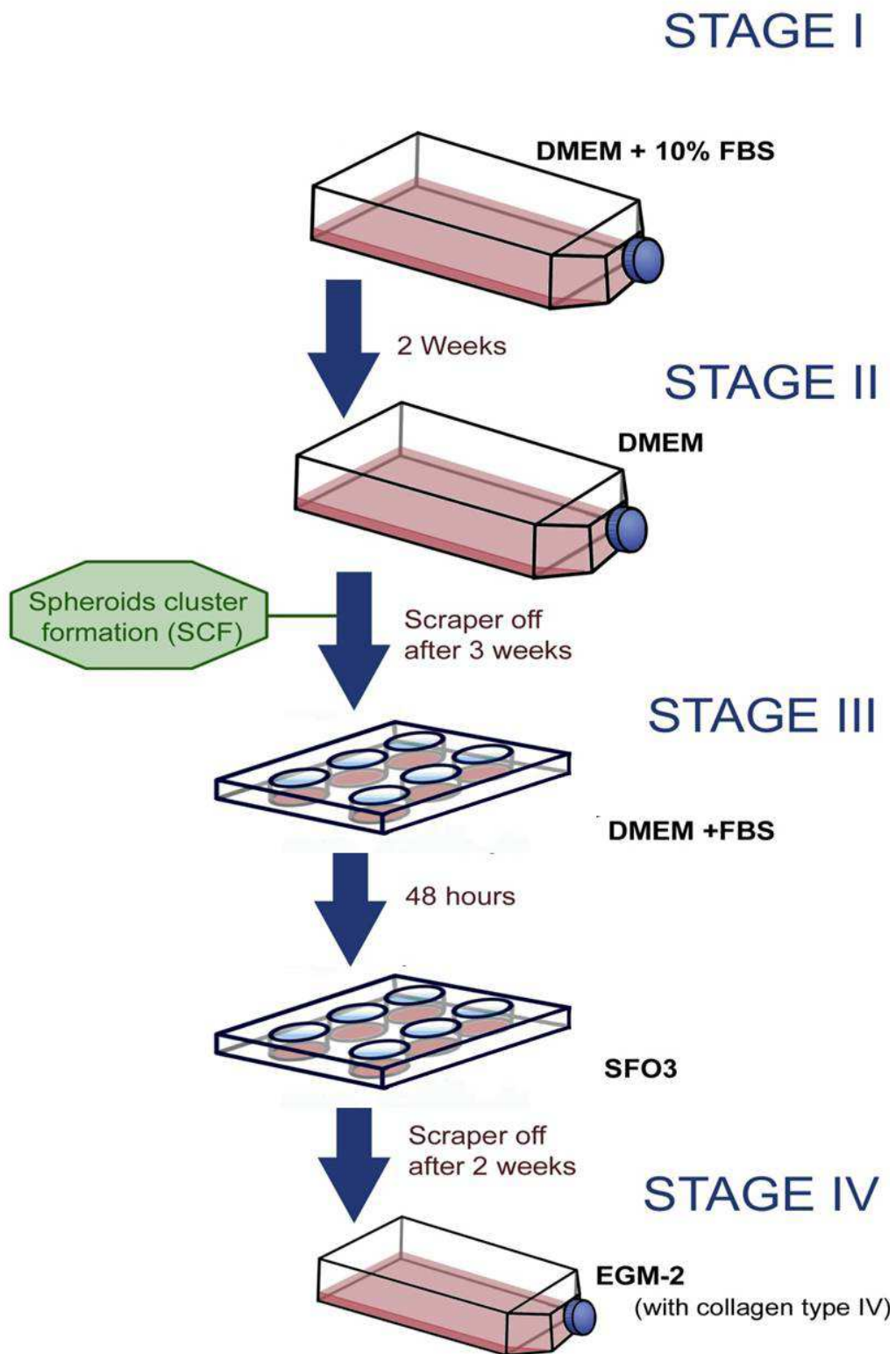


Figura 23. Proceso de obtención de células multipotentes de tipo endotelial (ME-LC) a partir de cultivos de células madre derivadas del tejido adiposo (hASC)

durante 48 h, para permitir la adhesión de los agregados celulares, tras lo cual fue sustituido éste por medio "SFO3" compuesto por una combinación de RPMI-1640:DMEM:F12 (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), suplementada con 0,1% de BSA (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), 50 μ M de 2- β -Mercaptoetanol (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) y 1% de la solución stock de penicilina y estreptomicina (Etapa III) (Figura 23) (Hirashima et al., 2003).

En las 3 semanas siguientes, las células fueron nuevamente despegadas mecánicamente con la ayuda de un scraper y subcultivadas en similares condiciones de temperatura, CO₂ y humedad indicadas previamente, en medio EGM-2, empleando para ello frascos de cultivo celular de 25 cm² de superficie recubiertos de colágeno tipo IV (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) para favorecer la adhesión celular (Etapa IV) (Figura 23). Las células obtenidas en las etapas III y IV fueron consideradas como ME-LC.

2.3. DIFERENCIACIÓN CARDIACA DE CÉLULAS MULTIPOTENTES DE TIPO ENDOTELIAL

Para los ensayos de diferenciación cardiomiocítica, ME-LC obtenidas de las etapas III y IV fueron sembradas a una concentración de 5-20 x 10³ céls/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Rochester, NY, EEUU) previamente recubiertas con Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU).

Para el recubrimiento de los pocillos se procedió a la descongelación del Matrigel, para lo cual se colocó en un vaso de precipitado con agua a 4°C durante al menos 1 h, para permitir una descongelación gradual, y una vez licuado se diluyó con medio EBM-2 también atemperado previamente a 4°C, así como las pipetas y placas utilizadas, ya que el Matrigel a mayor temperatura gelifica. La dilución del Matrigel se realizó paulatinamente hasta alcanzar una concentración final 1:20, mezclando vigorosamente con una pipeta y teniendo especial cuidado de evitar la formación de burbujas. Los pocillos fueron recubiertos completamente añadiendo en cada uno de ellos 50 μ L de esta solución y posteriormente fueron incubados a 4°C durante toda la noche, sellando las placas con Parafilm (The American National Can Company, Norwalk, CT, EEUU) para evitar la evaporación de la solución. Por último, las placas fueron incubadas 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual se retiró el exceso de la

solución de Matrigel y se realizó un lavado de los pocillos con EBM-2, quedando la superficie de cultivo recubierta por una capa laxa y sin grumos de Matrigel apropiada para la siembra de las células.

Las células fueron cultivadas durante 2 semanas en medio EGM-2 en las placas pretratadas con Matrigel, tras lo cual se procedió a inducir la diferenciación cardiomiocítica mediante la incubación de las células durante 24-48 h en medio EBM-2 suplementado con 5-aza (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) a una concentración de 5-10-15 μM . Tras la exposición a 5-aza, el medio fue sustituido nuevamente y las células fueron cultivadas durante 3-4 semanas en medio EGM-2, siendo posteriormente despegadas por disgregación enzimática de la matriz gelatinosa de los pocillos mediante el uso de Dispasa (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU).

El protocolo seguido para el despegue de las células de los pocillos recubiertos con Matrigel consistió en la retirada del medio de cultivo, y posteriormente la adición de 70 μL por pocillos de una solución de Dispasa de concentración 50 U/mL, previamente atemperada a 37°C, y se realizó una incubación a 37°C durante 2 h en una estufa de cultivo para asegurar la completa disolución del Matrigel. Transcurrido este tiempo, se procedió a la inactivación de la Dispasa mediante la adición de 500 μL por pocillo de una solución de PBS conteniendo una concentración 8 mM de EDTA (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), un agente quelante de iones como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} . Las células en suspensión fueron recuperadas de los pocillos y depositadas en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL, en los que previamente se habían depositado 4 mL de esta misma solución, que fueron centrifugados a 1.200 rpm durante 7 min, obteniendo un pellet celular que fue resuspendido en medio de cultivo EGM-2.

Por último, las células fueron subdivididas en 2 grupos para diferentes estudios: i) ensayos de inmunofluorescencia, para lo cual las células fueron sembradas en Chamber Slide System de 8 pocillos (Nunc, Rochester, NY, EEUU) a una concentración de $5-10 \times 10^3$ céls/pocillo, siendo cultivadas en este medio durante 4 días; ii) análisis por citometría de flujo, siendo sembradas las células destinadas a este estudio en frascos de cultivo con filtro de 25 cm^2 de superficie (Nunc, Rochester, NY, EEUU).

3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

3.1. SEPARACIÓN CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

3.1.1. BASADO EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE

En este estudio fueron separadas las subpoblaciones celulares CD44⁺/CD24^{neg} y CD44⁺/CD24^{low+} presentes en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Para la separación mediante FACS, las células fueron crecidas en placas de cultivo celular de 150 mm de diámetro (Nunc, Rochester, NY, EEUU), hasta conseguir un número aproximado de $1,5 \times 10^8$ células. Posteriormente, éstas fueron despegadas enzimáticamente con Tripsina-EDTA, lavadas con PBS y resuspendidas en 1 mL de Blocking Buffer (BB), compuesto por PBS, 2% de BSA y 2 mM de EDTA. La suspensión celular se colocó en un tubo de citómetro (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU), y las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos que reconocen específicamente estos antígenos de la superficie celular, utilizando para ello los anticuerpos anti-CD44 humano conjugado con el fluorocromo alofococianina (anti-CD44-APC) y el anti-CD24 humano conjugado con ficoeritrina (anti-CD24-PE) (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU), añadiendo 300 μ L de cada anticuerpo a la suspensión celular (ver protocolo detallado en el apartado 5.2.1.).

Previo a la separación por FACS, se procedió al enriquecimiento de la subpoblación CD44⁺/CD24^{low+}, mediante separación magnética de las células basada en la expresión del antígeno de superficie CD24 utilizando el kit de selección para PE EasySep[®] (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada). Para ello, una vez incubadas las células durante 30 min a temperatura ambiente con los anticuerpos descritos anteriormente, se añadió a la suspensión celular 200 μ L del cocktail de selección para PE proveído por el kit, que muestra afinidad por el fluorocromo mencionado, mezclando con una pipeta y dejando incubar 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 100 μ L de nanopartículas magnéticas, mezclando previamente la solución para conseguir una distribución homogénea de las nanopartículas, y tras resuspender la suspensión celular con una pipeta se realizó una incubación de 10 min a temperatura ambiente para permitir la unión de las nanopartículas a las moléculas del cocktail de selección añadido en el paso anterior. Por último, se adicionó BB hasta ajustar el volumen a 2,5 mL, se mezcló la suspensión

repiteando 2-3 veces y se procedió a la separación celular emplazando el tubo en un imán especial suministrado en el kit. Transcurridos 5 min se invirtió el tubo conjuntamente con el imán en un movimiento suave y se mantuvo invertido durante 2-3 seg, recogiendo el eluido que contiene las células CD24^{neg} en un nuevo tubo de citómetro, quedando las células CD24^{low+} en el tubo alojado en el imán. Posteriormente se retiró el tubo del imán, y se le adicionaron 2,5 mL de BB para proceder nuevamente a la separación celular, repitiéndose este proceso 2 veces más.

Una vez marcadas las células y separadas magnéticamente, fueron resuspendidas en 2 mL de BB y se procedió a realizar la separación celular por citometría de flujo, para aumentar la pureza de las subpoblaciones CD44⁺/CD24^{neg} y CD44⁺/CD24^{low+}. Para ello se empleó un citómetro de flujo analizador y separador celular modelo FACSAria III equipado con el software de adquisición y análisis FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU). La separación celular por citometría de flujo permite la separación física de las células en base a la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por técnicas de citometría de flujo analítica, en este caso la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD24. La detección de la luz emitida por los fluorocromos con los que están marcados los anticuerpos que reconocen específicamente estos antígenos superficiales es la base de esta técnica, ya que el software permite seleccionar y separar las poblaciones celulares en función de la presencia de estos fluorocromos. En este estudio, se procedió a la separación celular en función de la luz emitida por APC y PE, así pues, fueron seleccionadas por un lado las células que tras ser marcadas con ambos anticuerpos eran positivas para APC y negativas para PE, células CD44⁺/CD24^{neg}, y por otro lado aquellas que eran positivas para APC y además mostraron una positividad leve para PE, células CD44⁺/CD24^{low+}. Una vez separadas las subpoblaciones de interés, fueron sembradas independientemente en placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro (Nunc, Rochester, NY, EEUU) y cultivadas en medio DMEM-FBS para ser sometidas posteriormente a diferentes estudios.

3.1.2. BASADO EN LA ACTIVIDAD ALDEHÍDO DESHIDROGENASA

Para determinar la actividad ALDH en células de la línea T-84 de cáncer de colon humano se realizó un ensayo con el kit AldefluorTM (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada), que permite la determinación de esta actividad enzimática

gracias al uso de un sustrato fluorescente de la ALDH que difunde pasivamente al interior celular y, al ser metabolizado por esta enzima, genera un producto que mantiene la fluorescencia pero, que a diferencia del sustrato, está cargado negativamente lo que imposibilita su salida del interior celular de forma pasiva, acumulándose en el interior celular gracias al uso de un inhibidor de las bombas de eflujo MDR (ver protocolo detallado en el apartado 7.6.).

La separación de CSC en base a la alta actividad ALDH, se llevó a cabo en un citómetro de flujo analizador y separador celular modelo FACSAria III equipado con el software de adquisición y análisis FACSDiva, siendo seleccionadas aquellas células que mostraron una alta fluorescencia en el detector para FITC (Figura 24), células ALDH⁺, ya que el reactivo que provee el kit Aldefluor™ emite una fluorescencia verde similar a la de este fluorocromo. Una vez separadas las células que mostraban una alta actividad enzimática ALDH, éstas fueron sembradas en placas de cultivo de baja adherencia de 100 mm de diámetro (Corning Inc., Corning, NY, EEUU) y cultivadas en Medio de Esferas (ver protocolo detallado en el apartado 7.7.1.) para ser sometidas posteriormente a diferentes estudios. Este medio fue sustituido cada 48-72 h aproximadamente siendo siempre preparado justo antes de su utilización para evitar la pérdida de actividad de los suplementos que contiene.

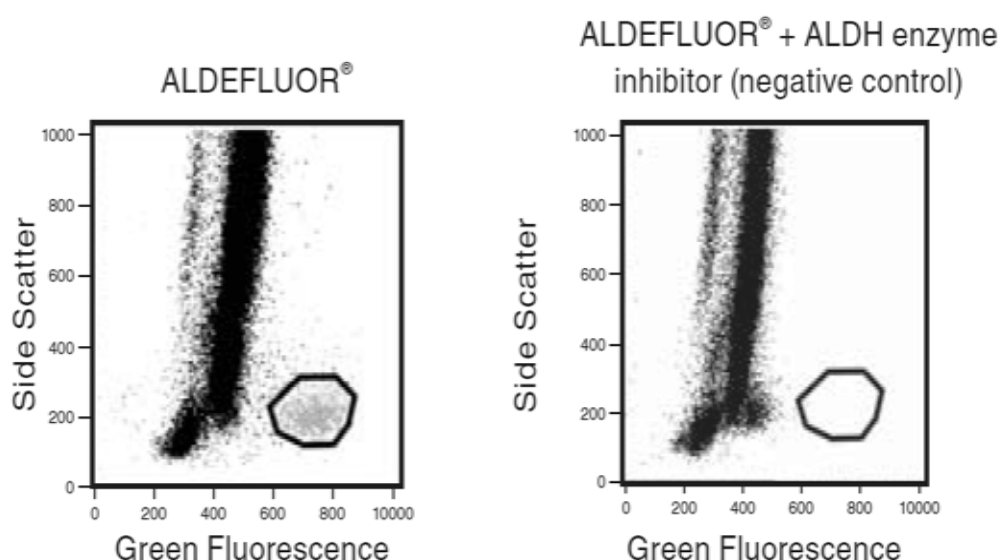


Figura 24. Selección de células con alta actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH⁺) mediante citometría de flujo (FACS) con el kit Aldefluor

3.2. SEPARACIÓN CELULAR EN BASE A LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN

A partir de las líneas celulares MCF-7, de cáncer de mama humano, y T-84, de cáncer de colon humano, se procedió a realizar una separación de las células en base a su capacidad de adhesión a la superficie de cultivo mediante un ensayo de tripsinización diferencial. Las células utilizadas para este estudio fueron crecidas en frascos de cultivo de 75 cm² en medio DMEM-FBS, hasta alcanzar una confluencia del 90%.

El método utilizado para separar las células en función de su capacidad de adhesión consistió en el tratamiento del cultivo celular con una solución diluida de tripsina, preparada a partir de una solución de Tripsina-EDTA que contiene tripsina porcina a una concentración de 0,25% (wt/vol), mediante su dilución 1:5 en HBSS, alcanzándose una concentración final de 0,05% wt/vol de tripsina y 0,53 mM de EDTA Na₄. Previamente al tratamiento, fue retirado el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS.

El tratamiento con tripsina diluida se llevó a cabo añadiendo 1 mL de esta solución al frasco de cultivo e incubando 5 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células despegadas fueron recuperadas mediante la adición de 10 mL de medio DMEM-FBS al frasco de cultivo, recogiendo el medio con células en suspensión con la ayuda de una pipeta, siendo estas células consideradas como tripsina-sensibles y las células que permanecían adheridas al frasco de cultivo como tripsina-resistentes. Las células obtenidas fueron depositadas en un tubo de 25 mL de policarbonato y centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se desechó y las células obtenidas fueron resuspendidas en 20 mL de PBS y divididas en 2 grupos: i) unas células fueron sembradas en frascos de cultivo con filtro de 25 cm² en un nuevo medio de cultivo, siendo clasificadas como “1^a Tripsinización”; ii) otras fueron subcultivadas nuevamente en frascos de cultivo con filtro de 75 cm² en medio DMEM-FBS, y nuevamente tratadas con tripsina diluida al día siguiente, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, para obtener las células clasificadas como “2^a Tripsinización”.

Las células tripsina-sensibles obtenidas de la 1^a y 2^a Tripsinización fueron sembradas en placas de cultivo de baja adherencia de 100 mm de diámetro y cultivadas en Medio de Esferas (ver protocolo detallado en el apartado 7.7.1.) para

posteriormente realizar diferentes estudios fenotípicos y funcionales. Este medio fue sustituido cada 48-72 h aproximadamente siendo siempre preparado justo antes de su utilización para evitar la pérdida de actividad de los suplementos que contiene.

4. ENRIQUECIMIENTO DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

4.1. TRATAMIENTO CON CITOQUINAS

Uno de los métodos utilizados para el enriquecimiento en CSC del cultivo de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 fue el tratamiento de las células con diferentes citoquinas: IL-6, también denominada como factor estimulador de las células B-2 (BSF-2) o IFN- β 2; IL-8, que recibe también el nombre de quimiocina CXC ligando 8 (CXCL8); proteína-10 interferón- γ -inducible (IP-10), también conocida como CXCL10 o pequeña-inducible citoquina B10; CCL2, que también se conoce como proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) o citoquina pequeña-inducible A2; y CCL5, también denominada como regulada por activación, expresada y secretada por células T normales (RANTES) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU).

En este estudio, las células fueron sembradas en placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro, a una densidad de 2×10^5 céls/placa, en medio DMEM-FBS, realizando triplicados para cada tratamiento así como para el control, que consistió en células cultivadas en DMEM-FBS sin citoquinas. Para el tratamiento de las células se adicionó al medio de cultivo una concentración de 10 ng/mL de cada citoquina, excepto IL-8 que fue añadida a una concentración de 100 ng/mL, siendo renovado el medio de cultivo cada 2 días para evitar la pérdida de actividad de las citoquinas (Figura 25). Las células fueron cultivadas en estas condiciones durante 7 días, siendo sometidas durante el cultivo a diversos estudios de citometría de flujo, proliferación celular y análisis del ciclo celular (Figura 25). Transcurrido este tiempo, parte de las células fueron empleadas en realizar estudios de expresión de proteínas mediante Western-Blot (ver protocolo detallado en el apartado 5.5.), mientras que otras células fueron utilizadas para realizar ensayos de la capacidad de formación de mamíferas y colonias en agar blando (Figura 25) (ver protocolos detallados en los apartados 7.7.1 y 7.8.). Durante el cultivo en agar blando para determinar la capacidad de formación de

colonias, las células fueron expuestas continuamente a citoquinas, mediante la adición a los cultivos de medio suplementado con citoquinas a la concentración especificada anteriormente cada 2 días.

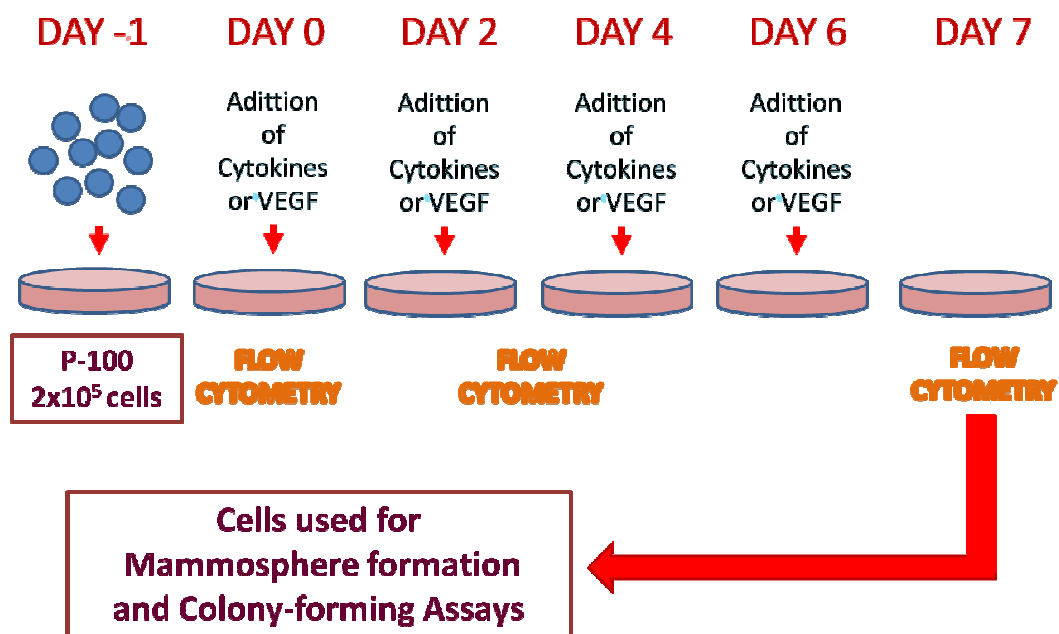


Figura 25. Protocolo seguido para el tratamiento con citoquinas o con el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

4.2. EXPOSICIÓN AL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

Para determinar el efecto de este factor de crecimiento en el incremento de las características CSC, las células de la línea tumoral de cáncer de mama humano MDA-MB-231 fueron sembradas a una densidad de 2×10^5 céls/placa en placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro, en medio DMEM-FBS. Transcurridas 24 h desde la siembra, se inició un ensayo para el cual las células fueron cultivadas durante 7 días en medio DMEM-FBS suplementado con 10 ng/mL de VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU), renovándose el medio de cultivo cada 2 días (Figura 25). Como control se cultivaron células MDA-MB-231 en medio DMEM-FBS en ausencia de VEGF en las mismas condiciones, realizando triplicados tanto para el grupo control como para el grupo de estudio. Durante los 7 días de cultivo las células fueron caracterizadas fenotípicamente mediante citometría de flujo, realizándose también estudios de proliferación celular y de la distribución del ciclo celular (Figura 25). Tras 7

días de cultivo de las células en presencia y ausencia de VEGF, las células fueron despegadas y destinadas a la realización de estudios funcionales de la capacidad de formación de mamíferas y colonias en agar blando (Figura 25) (ver protocolos detallados en los apartados 7.7.1 y 7.8), añadiéndose VEGF, a una concentración de 10 ng/mL, al cultivo en agar blando del grupo de estudio cada 2 días durante la duración del ensayo de formación de colonias.

Para los estudios de tumorigénesis *in vivo* con células tumorales de mama humanas expuestas a VEGF, se emplearon células obtenidas de tumores primarios del subtipo triple negativo, transducidas con un vector adenoviral que contenía una construcción que codificaba para una proteína verde fluorescente mejorada que emitía una mayor señal bioluminiscente (eGFP) y una proteína luciferasa modificada denominada como Luc2 (L2G) (Liu et al., 2010a). Estas células L2G, suministradas por el laboratorio de la Dra. Joyce M. Slingerland de la Universidad de Miami, fueron propagadas mediante xenotransplante seriado en ratones NOD/SCID, ya que estas células pierden rápidamente su viabilidad en cultivos bidimensionales, y recuperadas mediante disgregación de los tumores para el ensayo tras el 5^o pase. Una vez disgregadas, las células L2G fueron tratadas *in vitro* en cultivos en suspensión con una concentración de 10 ng/mL de VEGF durante 20 h para posteriormente ser inoculadas en ratones inmunodeficientes (ver apartado 7.9.2.).

5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

5.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO

A lo largo de todo el estudio se hizo un seguimiento de los cultivos celulares mediante su observación al microscopio, tanto para la identificación y localización de estructuras SCF en el proceso de obtención de ME-LC a partir de hASC, como para detectar modificaciones en la morfología celular a lo largo de todo el proceso y en los diferentes ensayos realizados con SC normales y tumorales. Para ello se utilizó un microscopio de fluorescencia modelo Leica DM5500 B (Leica, Solms, Germany) conectado a un monitor equipado con el software Leica CW4000 que permite la captura de imágenes.

5.2. CITOMETRÍA DE FLUJO

5.2.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE

Para el estudio del fenotipo de las células en cultivo se recurrió a la técnica denominada citometría de flujo, empleando para ello un citómetro de flujo modelo FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) equipado con 2 láseres, uno azul que emite luz a una longitud de onda de 488 nm y otro rojo que emite a 633 nm, así como detectores que permiten determinar el tamaño celular, la complejidad citoplasmática y la fluorescencia de 7 diferentes fluorocromos, y el software de análisis FACSDiva, gracias a la colaboración del Banco de Células Madre de Andalucía. Esta técnica se basa en el marcaje de las células con anticuerpos conjugados con fluorocromos que reconocen específicamente determinados antígenos humanos de la superficie celular. El citómetro de flujo permite determinar la expresión o no de los antígenos analizados, gracias a la medida de la luz emitida por los fluorocromos con los que están marcados los anticuerpos al ser excitados éstos por los láseres de los que consta el citómetro. Dependiendo del tipo celular fueron estudiados diferentes marcadores que están recogidos en la Tabla 8.

El protocolo seguido consistió en la separación de las células de las superficies de cultivo enzimáticamente con Tripsina-EDTA, siendo posteriormente lavadas con PBS e incubadas a temperatura ambiente durante 30 min en 3 mL de BB, compuesto por PBS, 2% de BSA y 2 mM de EDTA, para impedir la formación de uniones inespecíficas de los anticuerpos. Tras la incubación, las células en suspensión fueron repartidas en diversos tubos de citómetro para los diferentes controles y ensayos; se realizó una centrifugación de 5 min a 1.500 rpm, se desechó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 100 μ L de BB para ser incubadas con los anticuerpos seleccionados en cada estudio, así como con los respectivos controles de isotipo.

El marcaje se realizó añadiendo a la suspensión celular el volumen de cada anticuerpo especificado por su correspondiente casa comercial: 5 μ L de los anticuerpos monoclonales anti-CD105-APC y anti-CD-90-FITC (eBioscience Inc., San Diego, CA, EEUU); 10 μ L de los anticuerpos monoclonales anti-CD133-PE, anti-CD326-FITC (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EEUU), y anti-KDR-APC (R&D Systems,

Tabla 8. Antígenos de superficie estudiados en función del tipo celular

TIPO CELULAR	ANTÍGENOS SUPERFICIALES
hASC	CD105 CD73 CD90
ME-LC	CD133 CD45 CD34 CXCR4 KDR
MDA-MB-231	CD44 CD24
T-84	CD133 CD44 CD326
HT-29	CD133 CD44 CD326
MCF-7	CD24 CD44

Minneapolis, MN, EEUU); y 20 μ L de los anticuerpos monoclonales anti-CD73-PE, anti-CD45-APC-Cy7, anti-CD34-FITC, anti-CXCR4-PE, anti-CD44-APC y anti-CD24-PE (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU); usando los correspondientes controles de isotipo en los tubos control. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron a cada tubo de citómetro 2 mL de PBS, se realizó una centrifugación de 5 min a 1.500 rpm con el objetivo de eliminar los restos de anticuerpo no unido presentes en la suspensión

celular, y por último, el pellet de células fue resuspendido en 500 μ L de PBS para su análisis por citometría de flujo.

Para permitir la detección simultánea de la expresión de varios antígenos superficiales en una sola muestra, se seleccionaron en cada estudio anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos que, al ser excitados con el láser adecuado, producen una emisión de luz a una determinada longitud de onda (Tabla 9).

Tabla 9. Longitudes de onda de excitación y emisión de los fluorocromos seleccionados

FLUOROCROMO		LONGITUD DE ONDA DE EXCITACIÓN (nm)	LONGITUD DE ONDA DE EMISIÓN (nm)
APC	Alofococianina	633	660
APC-Cy7	Alofococianina-cianina7	633	785
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	488	519
PE	Ficoeritrina	488	578

5.2.2. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS

Para el estudio fenotípico de las células resultantes del tratamiento con 5-aza, aparte de un estudio por inmunofluorescencia, se incluyó un análisis por citometría de flujo para determinar la expresión citoplasmática de las proteínas humanas Troponina I cardíaca, Troponina T cardíaca, la cadena ligera reguladora de la miosina 2 (MYL2) y Lamina A/C, todas ellas relacionadas con la diferenciación cardíaca. Para ello, las células fueron despegadas de los frascos de cultivo enzimáticamente con Tripsina-EDTA, posteriormente lavadas 2 veces con PBS, realizando centrifugaciones de 5 min a 1.500 rpm, y repartidas en tubos de citómetro para los diferentes ensayos y controles.

Antes de iniciar el marcaje con los anticuerpos seleccionados se procedió a la fijación de las células y a la apertura de poros en la membrana para permitir la entrada de los anticuerpos al citoplasma. Para ello, se resuspendió el pellet de células resultante en 1 mL de paraformaldehído (PFA) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), forma polimerizada del formaldehído que permite la fijación celular, diluido en PBS a una concentración del 4%, y se realizó una incubación de 20 min a temperatura ambiente. Una vez las células fueron fijadas, se realizó un lavado con PBS y se procedió a la permeabilización de la membrana celular mediante el tratamiento con Tritón-X100 (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), un surfactante no iónico. El proceso consistió en la incubación de las células durante 15 min a temperatura ambiente con una solución de Tritón-X100 al 0,1% en PBS, tras lo cual se realizaron 2 lavados con PBS efectuando centrifugaciones a 2.500 rpm durante 5 min. Previo al marcaje con los anticuerpos, las células fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente en BB, compuesto por PBS, 2% de BSA y 2 mM de EDTA, para bloquear las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos; se realizó una nueva centrifugación de las células a 2.500 rpm durante 5 min, y se resuspendieron en 100 μ L de BB.

En este ensayo se procedió a realizar un marcaje indirecto, para lo cual primeramente las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios no unidos a fluorocromos detallados en la Tabla 10, añadiendo 10 μ L de cada anticuerpo tanto a los tubos de estudio como a los tubos control. Una vez añadidos, se realizó una incubación de 1 h a 4°C para permitir la unión de los anticuerpos a sus dianas citoplasmáticas y posteriormente las células fueron lavadas 2 veces con PBS, realizando centrifugaciones de 5 min a 2.500 rpm, para eliminar los anticuerpos no unidos, y las células fueron nuevamente resuspendidas en 100 μ L de BB. Seguidamente, se procedió a adicionar 10 μ L de los respectivos anticuerpos secundarios y controles de isotipo a los tubos, y se realizó una incubación de 1 h a 4°C. Los tubos de estudio fueron incubados con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo (Tabla 10), mientras que en los tubos control se añadieron los respectivos controles de isotipo, siendo éstos seleccionados en función de la fuente de obtención de los anticuerpos y fluorocromos ensayados en cada caso. Por último, se realizaron 2 lavados con PBS, se resuspendieron las células en 500 μ L de PBS, fueron adquiridas en un citómetro de flujo modelo FACS Canto II y los resultados fueron analizados con el software libre WinMDI 2.9.

Todos los anticuerpos primarios y secundarios usados (Tabla 10) fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU), excepto el anticuerpo primario anti-Troponina T cardiaca humana que fue obtenido de la casa comercial Sigma (Sigma Chemical co. St. Louis, MO, EEUU).

Tabla 10. Anticuerpos utilizados en los estudios de diferenciación cardiaca

ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
Anti-human Troponin T produced in mouse	Bovine anti-mouse IgG-FITC
Anti-human Troponin I produced in mouse	Bovine anti-mouse IgG-FITC
Anti-human Lamin A/C produced in goat	Donkey anti-goat IgG-FITC
Anti-human MYL2 produced in goat	Donkey anti-goat IgG-FITC

5.3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

5.3.1. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

Durante el cultivo de las células en las diferentes etapas del proceso de obtención de ME-LC a partir de hASC (ver protocolo detallado en el apartado 2.2.), se realizaron extracciones de RNA para posteriores estudios de expresión génica. Para ello, las células en cultivo fueron despegadas enzimáticamente con Tripsina-EDTA siguiendo el protocolo explicado con anterioridad. Una vez obtenido el pellet de células se procedió a la extracción de RNA o a su almacenaje a -80°C en tubos eppendorf de 1,5 mL (Eppendorf Corp., Hamburg, Germany) para su uso posterior, resuspendiendo previamente las células en 500 µL de RNAlater™ (Ambion, Inc., Austin, TX, EEUU).

Antes de proceder a la extracción de RNA, la superficie de trabajo, pipetas y otro material a utilizar fueron limpiados previamente con RNase Remove (Real, Valencia, Spain), una solución no alcalina que elimina completamente las contaminaciones de RNasas no deseadas de las superficies de trabajo y del material de vidrio y plástico. Para la extracción de RNA se empleó el kit RNeasy Mini (Qiagen,

Valencia, CA, EEUU), siguiendo el protocolo especificado por la casa comercial. Antes de iniciar el proceso, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, realizando centrifugaciones de 300 G a 20-25°C y desechando el sobrenadante.

Para proceder al lisado de las células, el pellet se resuspendió en 350 µL de Buffer RLT (Qiagen, Valencia, CA, EEUU), mezclando con un vortex, y las muestras fueron transferidas a tubos eppendorf de 1,5 mL y homogeneizadas, haciendo pasar las células 5 veces por una aguja de 0.9 mm de diámetro con ayuda de una jeringa (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU). Luego se añadió 350 µL de etanol (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) al 70% al lisado celular y se mezcló repipeteando. Posteriormente, se pasó 700 µL de la muestra por una RNase Mini Spin Column (Qiagen, Valencia, CA, EEUU) colocada sobre un tubo de colección de 2 mL, y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 seg y una temperatura de 20-25°C, empleando una microcentrífuga modelo 5417R (Eppendorf Corp., Hamburg, Germany). El eluido recogido en el tubo de colección fue descartado tras la centrifugación, se añadieron sobre la columna 350 µL de Buffer RW1 (Qiagen, Valencia, CA, EEUU) y se centrifugó nuevamente 15 seg a 12.000 rpm y 20-25°C para lavar la membrana de la columna.

En este punto del proceso, se procedió a eliminar los restos de DNA de la muestra mediante digestión con DNasa I. Primeramente se preparó una solución stock de DNasa I con 1.500 U Kunitz de DNasa I en agua libre de RNasas (Qiagen, Valencia, CA, EEUU). Posteriormente se diluyeron 10 µL de la solución stock en 70 µL de buffer RDD (Qiagen, Valencia, CA, EEUU), y esta solución se adicionó a la columna y se realizó una incubación de 15 min a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 350 µL de buffer RW1 y se centrifugó la columna 15 seg a 12.000 rpm y 20-25°C.

Una vez realizado el tratamiento con DNasa, se descartó el eluido, se transfirieron 500 µL de Buffer RPE (Qiagen, Valencia, CA, EEUU), al que previamente se le había adicionado etanol siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizó una centrifugación de 15 seg a 12.000 rpm y 20-25°C. Para lavar totalmente la membrana, se adicionaron nuevamente 500 µL de Buffer RPE a la columna, se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 min a 20-25°C, y por último se realizó una nueva centrifugación de 1 min a 12.000 rpm y 20-25°C, sin añadir ninguna solución sobre la columna y colocándola sobre un nuevo tubo de colección de 2 mL.

Tras este proceso, el RNA recolectado en la membrana fue recuperado colocando la columna en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL, añadiendo sobre ella 30-50 μ L de agua libre de RNasas y centrifugando durante 1 min a 12.000 rpm y 20-25°C, repitiendo este paso de nuevo en los casos que se esperaba obtener más de 30 μ g de RNA. El eluido obtenido conteniendo el RNA total de la muestra fue congelado a -80°C para su almacenamiento hasta proceder con el ensayo de expresión génica.

5.3.2. CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Una vez extraído el RNA total, se procedió a su cuantificación mediante espectrofotometría, tomando medidas de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro modelo Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Para tomar las medidas se diluyó una alícuota de 2 μ L de cada muestra de RNA en 198 μ L de agua libre de RNasas, se cargó en una cubeta de cuarzo y se introdujo en el espectrofotómetro.

Con los datos de absorbancia obtenidos, se calculó la pureza de ácidos nucleicos de la muestra a partir de la relación Abs_{260}/Abs_{280} , considerando óptimo un valor entre 1,8 y 2. Para determinar la concentración de RNA se tuvo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica (OD) a 260 nm es igual a una concentración de 40 ng/ μ L de RNA, multiplicando el valor obtenido por el factor de dilución utilizado para la medición (x100).

5.3.3. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA

Para determinar si el RNA estaba degradado se realizó una electroforesis en gel de agarosa (ver protocolo detallado en el apartado 5.3.5.). Para ello se preparó un gel de agarosa al 1%, y se procedió a realizar la electroforesis depositando 1 μ L de cada muestra de RNA por pocillo, añadiéndoles previamente en proporción 1:6 un tampón de carga (Loading buffer DNA I, AppliChem, Darmstadt, Deutschland). Esta técnica permite separar los fragmentos de RNA y DNA en función de su tamaño, siendo indicativo del buen estado del RNA la aparición de dos bandas bien definidas, correspondientes al RNA ribosómico 28S y 18S. La degradación del RNA se visualiza por la existencia de una calle del gel sin bandas definidas, con un marcaje con

bromuro de etidio difuso a lo largo de la misma. La existencia de una banda de mayor peso molecular a las anteriores determina la contaminación de la muestra con DNA.

5.3.4. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Las muestras de RNA fueron empleadas para realizar ensayos de expresión génica mediante la técnica de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El proceso de retrotranscripción permite sintetizar un DNA complementario (cDNA) de doble cadena a partir de un RNA molde, utilizando para ello una enzima denominada transcriptasa reversa (RT), también conocida como transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. Para este proceso se utilizó el kit SuperScriptII (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), que emplea la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney, y se procedió siguiendo las instrucciones indicadas en el kit. Primeramente se depositaron por cada muestra 2 µg de RNA en tubos eppendorf libres de nucleasas de 200 µL (Eppendorf Corp., Hamburg, Germany) y se colocaron en un recipiente con hielo, al igual que los reactivos del kit. Seguidamente, se añadieron a cada tubo de reacción 1 µL de Oligo(dT)₁₂₋₁₈, que contiene 500 µg/mL de primers aleatorios; 1 µL de dNTP, conteniendo 10 mM de cada dNTP; y se añadió agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen de 12 µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Una vez preparados los tubos, fueron calentados a 65°C durante 5 min en un termociclador modelo MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU) e inmediatamente después colocados en hielo. Posteriormente, se adicionaron a la mezcla 4 µL de 5X First-Strand Buffer y 2 µL de una solución 0,1 M de ditiotreitól (DTT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), un agente reductor que ayuda a romper los puentes disulfuro, desorganizando la estructura secundaria del RNA y facilitando la acción enzimática de la RT, y se calentaron las muestras 2 min a 42°C. Por último, se añadió a cada tubo 1 µL de SuperScript™ II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), que contiene 200 U de esta enzima, y se procedió a la síntesis del cDNA incubando las muestras 50 min a 42°C. Para detener la reacción, los tubos fueron calentados posteriormente a 70°C durante 15 min.

Tras obtener el cDNA se llevó a cabo una PCR empleando una mezcla comercial previamente preparada (2X ReddyMix PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Epsom, UK). Las secuencias de las parejas de cebadores, también

denominados primers, y los tamaños de los productos esperados tras la PCR para cada gen estudiado se muestran en la Tabla 11. El protocolo seguido para cada reacción consistió en la adición de 2 μ L de cDNA, 0,25 μ L de cada primer a concentración 50 μ M (EcoGen, Barcelona, Spain), añadiendo en cada reacción una sola pareja de primers específica del gen estudiado (Tabla 11), 22,5 μ L de agua libre de nucleasas y 25 μ L de 2X ReddyMix PCR Master Mix a un tubo eppendorf libre de nucleasas de 200 μ L. Las concentraciones finales de los componentes de la reacción fueron aproximadamente 3,2 μ g/mL de cDNA, 0,25 μ M de cada primer, 1,25 U de Thermoprime Plus DNA Polymerase, 75 mM de Tris-HCl a pH 8,8, 20 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,01% (vol/vol) de Tween[®] 20 y 0,2 mM de cada dNTP.

Una vez preparadas las reacciones, los tubos fueron colocados en un termociclador modelo MJ Mini Gradient Thermal Cycler. Primeramente, las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente calentándolas a 94°C durante 2 min, y posteriormente fueron sometidas a 35 ciclos de PCR. Cada ciclo constó de 3 fases: i) fase de desnaturalización, en la que las muestras fueron calentadas a 94°C durante 30 seg; ii) fase de hibridación del cebador, de 1 min de duración, siendo las temperaturas de fusión (del inglés “melting temperature”, Tm) utilizadas de 51 °C para *FLT-1*, *TIE-2*, *DLL4*, *CDK2* y *β -actina*, y de 43 °C para *CXCR4*, *CD133* y *CCR7*; iii) y fase de elongación, de 1 min de duración a 72°C, temperatura a la cual la enzima Taq DNA polimerasa muestra su máxima actividad. Una vez finalizada la reacción, las muestras fueron conservadas a 4°C para su posterior estudio.

5.3.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

El estudio de la integridad del RNA, así como de los productos obtenidos tras la RT-PCR, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa, empleándose una concentración de agarosa del 1% y del 1,5% respectivamente. Para la preparación del gel se añadieron 0,5 ó 0,75 g de agarosa (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), según la concentración de agarosa deseada, a 1 mL de un tampón de electroforesis de pH 8 denominado TAE 50X, compuesto de Tris-Acetato (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) a una concentración 2 M y 0,5 M de EDTA, y se completó con agua bidestilada hasta un volumen final de 50 mL. Esta solución se calentó hasta ebullición, se le añadieron 2 μ L de bromuro de etidio de una solución stock de concentración 10 mg/mL (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), sustancia que se intercala entre

Tabla 11. Secuencia de los primers utilizados en los estudios mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

GEN	SECUENCIA DE PRIMERS	TAMAÑO PRODUCTO
<i>CD133</i>	Fw: 5'-CTA GAT ACT GCT GTT GAT GTC-3'	361 bp
	Rev: 5'-TCC TTG TAG ACC CAG AAA CT-3'	
<i>CCR7</i>	Fw: 5'-CAG CCT TCC TGT GTG GTT-3'	219 bp
	Rev: 5'-AGG AAC CAG GCT TTA AAG T-3'	
<i>TIE-2</i>	Fw: 5'-AAC TCT GTG TGC AAC TGG TCC-3'	181 bp
	Rev: 5'-AAG TCA TCT TCC GAG CTT GG-3'	
<i>CXCR4</i>	Fw: 5'-AGA ACC AGC GGT TAC CAT-3'	174 bp
	Rev: 5'-ATG CCA GTT AAG AAG ATG AT-3'	
<i>DLL4</i>	Fw: 5'-ACT ACT GCA CCC ACC ACT CC-3'	359 bp
	Rev: 5'-CCT GTC CAC TTT CTT CTC GC-3'	
<i>CDK2</i>	Fw: 5'-CCT GGC ACT GAG ACT GAG GG-3'	516 bp
	Rev: 5'-CTC AGA ATC TCC AGG GAA CAG G-3'	
<i>FLT-1</i>	Fw: 5'-CAC CAA GAG CGA CGT GTG-3'	196 bp
	Rev: 5'-TTT TGG GTC TCT GTG CCA G-3'	
<i>β-actin</i>	Fw: 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AA-3'	318 bp
	Rev: 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3'	

las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz UV, se vertió sobre un molde y se colocó un peine para formar los pocillos. Una vez solidificado el gel de agarosa a temperatura ambiente, se retiró el peine y quedó preparado para llevar a cabo la electroforesis.

El gel fue colocado en la cubeta de electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU), se añadió un tampón de electroforesis TAE 1X, de concentración 40 mM de Tris-Acetato y 1 mM de EDTA, hasta cubrir el gel completamente y se procedió a cargar el patrón de pesos moleculares y las muestras en los pocillos del gel. Como patrón de pesos moleculares se utilizó Hyperladder I (Bioline, London, UK), cargando 5 μ L en el primer pocillo, para permitir determinar el tamaño de las bandas una vez corrido el gel. Las muestras fueron cargadas en los pocillos restantes, a razón de 20 μ L por pocillo, añadiéndoles previamente en proporción 1:6 un tampón de carga (Loading buffer DNA I). Una vez cargado se aplicó una diferencia de potencial, inicialmente de 55 V, hasta que se produjo desplazamiento de las muestras del pocillo del gel, aumentándola a 80 V hasta que el frente avanzó hasta aproximadamente las 3/4 partes del gel. Esta diferencia de potencial provoca el desplazamiento de las muestras desde el polo negativo al positivo debido a la carga negativa de los ácidos nucleicos.

Una vez corrido el gel, se procedió a su visualización por transiluminación con luz UV en el densitómetro molecular Imager Gel Doc XR System usando el software Quantity One 4.5.2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU).

5.4. INMUNOFLUORESCENCIA

Las muestras seleccionadas para su marcaje y estudio por inmunofluorescencia fueron células ME-LC tratadas con 5-aza, para inducir su diferenciación cardiomiocítica, y posteriormente cultivadas en Chamber Slide System de 8 pocillos (ver protocolo detallado en el apartado 2.3.). Para confirmar el fenotipo cardiaco se realizó un marcaje indirecto citoplasmático para determinar la expresión de las proteínas cardiacas humanas Troponina T, Desmina y α -Actinina sarcomérica.

Para realizar este ensayo, se retiró el medio de los pocillos, se realizaron 3 lavados con PBS y se procedió a fijar las células añadiendo una solución de PFA al 4% en PBS, realizándose una incubación de 30 min a temperatura ambiente. Una vez las células fueron fijadas, se realizó un lavado con PBS y se procedió a la permeabilización de las membranas celulares mediante la adición de una solución de Tritón-X100 al 0,1%, diluido en PBS, dejando incubar 15 min a temperatura ambiente. Tras esto, se retiró la solución permeabilizante, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron las células durante 1 h a temperatura ambiente con BB, para impedir que se produjesen uniones inespecíficas de los anticuerpos. Este BB fue preparado a partir de una solución que contenía 1% de ácido maleico 100 mM y 1% de NaCl 150 mM (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) en agua bidestilada. Una vez ajustado el pH a 7,5, se añadió Blocking Reagent 10X (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, EEUU) al 10%, y se diluyó esta solución en PBS hasta alcanzar una concentración del 2%, quedando así preparado el BB.

Para el marcaje de las células fijadas y permeabilizadas con los anticuerpos primarios, se añadieron 100 μ L a cada pocillo de las diluciones 1:100 en BB de los anticuerpos no conjugados con fluorocromo anti-Troponina T cardiaca humana producido en ratón (Research Diagnostics, Flanders, NJ, EEUU), anti-Desmina humana producido en conejo y anti- α -Actinina sarcomérica humana producido en ratón (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU). Las células fueron incubadas a 4°C durante toda la noche y posteriormente se retiró el exceso de anticuerpo no unido realizando 3 lavados con PBS de 15 min cada uno y en agitación suave.

Tras esto, se añadieron a los pocillos 100 μ L de los siguientes anticuerpos secundarios, previa dilución 1:200 en BB: anti-IgG de conejo conjugado con FITC, el cual se une al anticuerpo primario anti-Desmina; anti-IgG de ratón conjugado con TRICT (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU), que se une a los anticuerpos primarios anti-Troponina T cardiaca y anti- α -Actinina sarcomérica. Las muestras se incubaron durante 1-2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Luego se hicieron 3 lavados con PBS, de 15 min cada uno en agitación suave y oscuridad, para descartar el exceso de anticuerpo no unido. Como control interno del ensayo, células que no habían sido incubadas con anticuerpos primarios, fueron incubadas con las diluciones de los anticuerpos secundarios enumerados anteriormente con el objetivo de determinar la fluorescencia producida por la unión inespecífica de éstos.

Por último, se retiró la estructura desmontable del Chamber Slide System que delimita los pocillos, quedando éste convertido en un portaobjetos, se añadieron unas gotas de una solución de montaje (Ultra Cruz™ Mounting Medium, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) que contiene 1,5 µg/ml de 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI), un colorante que se une al DNA tiñendo el núcleo de azul; se colocó un cubreobjetos evitando la formación de burbujas, y se tomaron imágenes de las muestras en un microscopio de fluorescencia Leica DM5500 B equipado con el software Leica CW4000.

5.5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT

5.5.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para la extracción de proteínas se utilizó una solución denominada “buffer de extracción de proteínas” cuya elaboración se detalla a continuación. Primeramente se preparó una solución que contenía 6,05% de Tris y 0,4% de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) diluidos en agua bidestilada, y se ajustó el pH a 6,8. De esta solución se tomaron 12,5 mL y se añadieron 2 g de SDS, 10 mL de glicerol (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) y agua bidestilada hasta obtener un volumen de 25 mL. El buffer utilizado se obtuvo añadiendo 250 µL de 2-β-mercaptoetanol a 800 µL de la solución anterior, y adicionando agua bidestilada hasta alcanzar un volumen de 5 mL.

El protocolo seguido para la extracción de proteínas a partir de células cultivadas en placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro consistió en la retirada del medio de cultivo y el lavado del cultivo celular con PBS. Posteriormente se añadieron 100 µL del buffer de extracción de proteínas y, con ayuda de un scraper, se procedió a raspar la superficie de cultivo. El SDS que contiene este buffer es un detergente aniónico que permite solubilizar y desnaturalizar las proteínas, quedando éstas unidas al SDS, obteniéndose una solución viscosa que fue recogida con ayuda de una punta de extremo ancho de 100 µL y depositada en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Por último, las muestras se incubaron a 100°C durante 10 min en una incubadora de tubos de 1,5 mL modelo ThermoStat plus (Eppendorf Corp., Hamburg, Germany), para permitir que el SDS recubra los polipéptidos alrededor de su eje central, manteniéndolos desplegados, y posteriormente se almacenaron las muestras a -20°C.

5.5.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras obtenidas se empleó el método de Bradford, que se basa en la unión no covalente del azul de Coomasie a las proteínas (Bradford, 1976). Este compuesto presenta diferentes espectros de absorción según su estado de protonación: la forma catiónica muestra un máximo de absorbancia a 470 nm, la neutra a 650 nm y la aniónica a 595 nm. La unión del azul de Coomasie a las proteínas desplaza este equilibrio hacia la forma aniónica, permitiendo medir la concentración de proteínas de una solución al existir una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas en las muestras de estudio, se elaboró una recta patrón con soluciones de proteínas a concentración conocida. Para ello se prepararon soluciones de BSA de concentración 1,4-1-0,7-0,35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, diluidas en una disolución 1:4 de buffer de extracción de proteínas en agua bidestilada, que además fue utilizada como blanco (solución de concentración 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Una vez preparadas estas soluciones, se depositaron en cubetas de cuarzo 500 μL de reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU) diluido 1:5 en agua bidestilada, y se añadieron en cubetas independientes 5 μL de cada solución de BSA y 5 μL de las muestras previa dilución 1:4 en agua bidestilada. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm de las soluciones de BSA de concentración conocida, así como de las muestras, en un espectrofotómetro modelo Ultrospec 2000. La concentración de proteínas de las muestras fue obtenida a partir de la recta elaborada con las soluciones de concentración conocida de BSA y la posterior multiplicación del valor obtenido por el factor de dilución utilizado en la medición.

5.5.3. ELECTROFORESIS

Las proteínas fueron separadas en base a su tamaño mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) (Shapiro et al., 1967). Este proceso requiere que las proteínas estén desnaturizadas y cargadas eléctricamente. La desnaturización se consigue por la utilización de compuestos como el 2- β -mercaptoetanol, un agente reductor que rompe los enlaces disulfuro y asegura la completa desnaturización de las proteínas, y principalmente por el SDS, que además confiere una carga negativa a las proteínas proporcional a su masa.

La separación mediante electroforesis se realizó en un gel compuesto por dos partes, una superior denominada gel concentrador, cuya función es la de concentrar las proteínas, y una inferior conocida como gel de resolución, que permite la separación de las proteínas en función de su tamaño. La preparación de los geles concentrador y de resolución, se realizó en tubos de poliestireno de 30 mL añadiendo los reactivos (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) que se muestran en la Tabla 12, siendo utilizada una concentración de acrilamida del 10% para el gel de resolución. El persulfato de amonio (APS) y la tetrametiletilendiamina (TEMED) fueron añadidos a las soluciones preparadas para ambos geles inmediatamente antes de ser utilizados, ya que provocan la polimerización de la acrilamida, produciéndose la gelificación completa en aproximadamente 15 min. Una vez preparadas las soluciones, se procedió al montaje de los cristales sobre su soporte (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU), se añadió el gel de resolución en el hueco de 1 mm de grosor formado por los cristales hasta cubrir aproximadamente 3/4 partes, se dejó solidificar en posición horizontal a temperatura ambiente, y posteriormente se depositó sobre éste el gel concentrador hasta cubrir completamente los cristales, colocándose un peine antes de la solidificación del gel a temperatura ambiente para la formación de los pocillos.

Tabla 12. Preparación de los geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

REACTIVOS	GEL DE RESOLUCIÓN	GEL CONCENTRADOR
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,25 mL
Agua bidestilada	4,02 mL	3,05 mL
SDS 10%	0,1 mL	50 µL
Acrilamida 30%	3,33 mL	650 µL
APS 10%	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Una vez solidificado completamente el gel, se retiró el peine, se colocó en una cámara de electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU) y se añadió una solución denominada “buffer de electroforesis”, conteniendo 25 mM de Tris, 192 mM de Glicina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) y 0,1% de SDS en agua bidestilada, hasta cubrir completamente el gel. Seguidamente se procedió a cargar las muestras en los pocillos con ayuda de una pipeta, para ello se tomaron 50 μ g de proteínas de cada muestra diluidas en 20 μ L de agua bidestilada y se les añadió 5 μ L de un tampón de carga 5X, compuesto por 250 mM de Tris-HCl de pH 6,8, 10% de SDS, 30% de glicerol (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), 0,5 M de DTT y 0,02% de azul de bromofenol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), cargando en uno de los pocillos 10 μ L de un patrón de pesos moleculares de proteínas premarcadas (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU).

Tras cargar las muestras, se aplicó una diferencia de potencial eléctrico de 100 V, provocando el desplazamiento de las proteínas hacia el polo positivo gracias a la carga negativa conferida por el SDS. Una vez avanzó el frente de electroforesis unas 4/5 partes del gel de resolución, que puede observarse visualmente gracias a la presencia del colorante azul de bromofenol, se procedió a retirar el gel de la cubeta de electroforesis.

5.5.4. TRANSFERENCIA

Para realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de difluor polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU), se empleó un sistema de transferencia en tanque. Se retiró el gel de los cristales y se eliminó la parte correspondiente al gel concentrador. Antes de montar los componentes del sándwich para la transferencia, se sumergió la membrana en metanol (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) durante 10 min y posteriormente las esponjas, el papel de filtro y las membranas fueron sumergidos durante 10 min más en una solución denominada “buffer de transferencia”, compuesta por 25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 20% de metanol. Seguidamente se montó el sándwich colocando los componentes siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU), y se cubrió el tanque con el buffer de transferencia especificado.

Una vez preparado el sándwich, se colocó en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU) y se aplicó una diferencia de potencial de 100 V durante 2 h. La membrana de PVDF fue posteriormente recuperada e incubada 5 min en agitación suave y temperatura ambiente con una solución de Ponceau S de concentración 0,1% en 5% de ácido acético (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), para comprobar la correcta transferencia a la membrana, ya que este colorante tiñe las proteínas de rojo.

5.5.5. BLOQUEO Y MARCAJE CON ANTICUERPOS

La membrana de PVDF fue lavada 3 veces con TBS, compuesto por 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris y un pH de 8 ajustado con HCl (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), aplicando agitación suave para favorecer el lavado, y seguidamente se procedió al bloqueo de la membrana con BB incubándola durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente. El BB utilizado estaba compuesto por una solución de TBS suplementada con 0,1% de Tween[®] 20 (TBS-Tween20) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) y 5% de leche desnatada.

Una vez transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de la membrana, de 5 min cada uno y en agitación suave, con TBS-Tween20 y se procedió al marcaje con los anticuerpos primarios. Para ello se realizaron diluciones 1:1.000 de los anticuerpos no conjugados que reconocen específicamente las proteínas humanas cleaved NOTCH1 (NICD), SOX2, c-MYC y β -actina (Cell Signalling Tech, Danvers, MA, EEUU) en BB y se añadió un volumen suficiente para cubrir por completo el fragmento de membrana obtenido para cada anticuerpo, realizando una incubación a 4°C y agitación suave durante toda la noche.

Posteriormente se realizaron 3 lavados de la membrana a temperatura ambiente y agitación suave con TBS-Tween20 y se añadió una dilución 1:3.000 en BB de un anticuerpo secundario anti-Rabbit IgG conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Promega, Madison, WI, EEUU), ya que los anticuerpos primarios utilizados habían sido producidos en conejo. Tras una incubación de 1 h a temperatura ambiente y agitación suave, se retiró la solución de anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados de la membrana de PVDF con TBS-Tween20 de 5 min cada uno y aplicando agitación suave.

5.5.6. REVELADO

Para el revelado de la membrana se empleó el kit Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU) que contiene un sustrato quimioluminiscente de la enzima HRP, el luminol, y un buffer que mantiene estable la actividad de la peroxidasa; y la luz emitida fue captada con una película de rayos-X (CL-XPosure Film, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU).

El protocolo seguido consistió en la mezcla en relación 1:1 de las soluciones de luminol y buffer de estabilidad de peroxidasa provistas en el kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU) y se adicionó a la membrana con ayuda de una pipeta Pasteur. Tras incubar 5 min en agitación suave y temperatura ambiente, se retiró la solución de sustrato y la membrana fue cubierta con un plástico transparente. El luminol es oxidado en presencia de HRP y peróxido de hidrógeno, originando un producto excitado eléctricamente denominado 3-aminofalato, siendo captada la luz emitida a 425 nm por este dianión mediante auto-radiografía con una película CL-XPosure dispuesta sobre la membrana en un soporte de aluminio en una habitación oscura. Esto permitió la aparición de una banda correspondiente a la proteína estudiada, en cada caso en aquellas muestras en las que estaba expresada.

6. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR

6.1. MEDIANTE TINCIÓN CON BROMODESOXIURIDINA / YODURO DE PROPIDIO

La tinción con Bromodesoxiuridina / Yoduro de Propidio (BrdU/PI) fue empleada para el estudio de la distribución del ciclo celular en células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano. Esta técnica utiliza un nucleósido sintético análogo a la timidina, la bromodesoxiuridina (BrdU), que se incorpora al DNA de las células proliferantes que se encuentran en la fase S del ciclo celular, y el marcaje con yoduro de propidio (PI), un colorante que se intercala entre las bases del DNA.

El protocolo seguido consistió en la adición al medio de cultivo de una solución de BrdU (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) a una concentración final 10 μ M, incubando 2 h a 37°C. Posteriormente las células fueron despegadas de la superficie

de cultivo con Tripsina-EDTA y fueron resuspendidas en 500 μ L de PBS. Para la fijación de las células se añadió por goteo una solución fría de etanol al 70% con ayuda de una pipeta Pasteur y manteniendo las células en agitación suave. Tras alcanzarse un volumen de 6 mL, las células fueron conservadas a -20°C durante un periodo comprendido entre 1 y 7 días.

Una vez fijadas las células, se procedió al marcaje con un anticuerpo conjugado específico para BrdU y con PI. Para ello, primeramente las células fueron lavadas 2 veces con una solución de lavado compuesta por PBS conteniendo 0,5% de BSA, realizando centrifugaciones de 5 min a 2.000 rpm y a 4°C . Seguidamente las células fueron resuspendidas en 1 mL de una solución desnaturalizante de HCl 2 M y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 7 mL de solución de lavado y se realizó una centrifugación de 5 min a 2.000 rpm, para posteriormente resuspender las células en 500 μ L de borato de sodio 0,5 M e incubar 2 min a temperatura ambiente para neutralizar cualquier residuo de ácido de la muestra. Posteriormente se realizaron una serie de lavados con la solución descrita anteriormente, primeramente añadiendo 2 veces 7 mL de solución de lavado y posteriormente 3 veces con un volumen de 1 mL, realizando centrifugaciones de 5 min a 2.000 rpm. Tras los lavados, las células fueron resuspendidas en 50 μ L de una dilución 1:10 de anticuerpo anti-BrdU-FITC (eBioscience Inc., San Diego, CA, EEUU) en PBS conteniendo 0,5% de Tween[®] 20 y 0,5% de BSA, e incubadas en oscuridad durante 1 h a 4°C . Transcurrido este tiempo se añadió a la suspensión celular 1 mL de solución de lavado y se realizó una centrifugación de 5 min a 2.300 rpm, descartando el sobrenadante. Por último, se procedió al marcaje con PI, por lo que las células fueron incubadas en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente en 500 μ L de una solución de PBS conteniendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) y posteriormente, puestas en hielo para su estudio por citometría de flujo.

Una vez marcadas las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo modelo LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) equipado con el software de análisis FACSDiva. Las células fueron excitadas con un láser azul de 488 nm, midiéndose la fluorescencia emitida por PI en el canal 695/40, que detecta la luz emitida en longitudes de onda comprendidas entre 675 y 715 nm, y la del FITC en el

canal 530/30, que cubre un rango de longitud de onda entre 515 y 545 nm, siendo adquiridas 10^4 células por muestra.

6.2. MEDIANTE TINCIÓN CON HOECHST 33342

Otro método utilizado para el estudio de la distribución del ciclo celular en células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano consistió en la tinción del DNA con el colorante Hoechst 33342, ya que este colorante fluorescente se incorpora al DNA entre las secuencias "AT". Para ello, las células cultivadas en placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro fueron incubadas a 37°C durante 45 min en medio DMEM-FBS conteniendo 5 µg/mL de Hoechst 33342 y 50 µM de verapamilo (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU). El verapamilo es un inhibidor de los transportadores MDR, y fue adicionado para evitar la exclusión del colorante del interior celular por estas proteínas. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron despegadas enzimáticamente con Tripsina-EDTA y resuspendidas en 100 µL de BB, compuesto por PBS, 2% de BSA y 2 mM de EDTA, en tubos de citómetro.

Posteriormente, las células fueron mantenidas a 4°C y se procedió al marcaje con los anticuerpos anti-CD44-APC y anti-CD24-PE, para permitir el estudio del ciclo celular en las subpoblaciones CD44⁺/CD24^{neg} y CD44⁺/CD24^{low+}. La tinción con los anticuerpos se realizó añadiendo 20 µL de cada anticuerpo a la suspensión celular e incubando 45 min a 4°C. Posteriormente se añadieron 2 mL de PBS a cada tubo de citómetro, se realizó una centrifugación de 5 min a 1.500 rpm y a 4°C, y las células fueron resuspendidas en 500 µL de PBS y colocadas en hielo para su posterior análisis por citometría de flujo.

Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) equipado con el software de análisis FACSDiva. Para el estudio del marcaje con Hoechst 33342 fue medida la intensidad de fluorescencia a 450 nm, Hoechst azul, siendo estudiada la distribución del ciclo celular en las subpoblaciones CD44⁺/CD24^{neg} y CD44⁺/CD24^{low+} mediante la adquisición de 10^5 eventos y la creación de gate específicos para cada subpoblación celular con el software de análisis en base a la fluorescencia emitida por los fluorocromos APC y PE.

7. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

7.1. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSEO

Para la caracterización funcional de las hASC obtenidas de lipoaspirados, las células fueron sembradas a una densidad celular de 2×10^3 céls/cm² en placas de cultivo celular de 6 pocillos en medio DMEM-FBS y fueron cultivadas 24 h para permitir la adhesión de las células a la superficie de cultivo. Posteriormente el medio de cultivo fue reemplazado por medios de inducción de diferenciación adipocítica, osteocítica y condrocítica específicos. Una vez finalizados los diferentes ensayos de diferenciación, las muestras fueron teñidas con los diferentes colorantes siguiendo el protocolo detallado a continuación, y fueron estudiadas por microscopía óptica utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM5500 B equipado con el software Leica CW4000, tomándose imágenes de los diferentes cultivos.

La diferenciación adipogénica fue inducida mediante el cultivo de las células en medio Adipogenic MSC Differentiation BulletKit (Lonza, Basel, Switzerland) durante 2 semanas. La determinación del fenotipo adipocítico se realizó mediante tinción con Rojo Aceite O, un colorante que tiñe de rojo las vacuolas lipídicas citoplasmáticas características de los adipocitos. Para este ensayo se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se realizaron 3 lavados con PBS. Antes de realizar la tinción, las células fueron fijadas con PFA al 4%, incubando 20 min a temperatura ambiente, y seguidamente se realizaron 2 lavados con PBS y un último lavado con isopropanol (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) al 60%. Una vez fijadas las células se añadieron a cada pocillo 3 mL de una solución de Rojo Aceite O (Amresco, Solon, OH, EEUU), al 0,5 % preparada en isopropanol al 60%, y las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 min. Por último, se retiró la solución de Rojo Aceite O y las muestras fueron lavadas primeramente con isopropanol al 60% y posteriormente 2 veces con PBS.

Para inducir la diferenciación osteocítica de las hASC, las células fueron cultivadas durante 2 semanas en medio Osteogenic MSC Differentiation BulletKit (Lonza, Basel, Switzerland) siendo confirmada posteriormente la diferenciación

osteocítica con Rojo de Alizarina S, que tiñe los depósitos de calcio de la ECM presentes en células de linaje osteogénico. Las células fueron primeramente fijadas siguiendo el protocolo descrito para la tinción con Rojo Aceite O. Tras realizar 3 lavados con PBS, se adicionó a los pocillos una solución de pH 4,2 de Rojo de Alizarina S (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) al 2%, diluido en agua bidestilada, y se realizó una incubación de 20 min a temperatura ambiente. Por último, se retiró la solución de Rojo de Alizarina S y se realizaron 3 lavados con agua bidestilada.

El medio NH ChondroDiff Medium (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EEUU) fue utilizado para inducir la diferenciación condrocítica. Las células fueron cultivadas durante 3 semanas en este medio y posteriormente se realizó una tinción con Azul de Toluidina O para determinar la existencia de glicoconjugados aniónicos, como los proteoglicanos y GAG, en las células. Para este estudio primeramente se retiró el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados de los pocillos con PBS. Seguidamente, las células fueron fijadas con PFA al 4%, incubando 20 min a temperatura ambiente, y transcurrido este tiempo se retiró la solución fijadora y se realizaron 3 lavados con PBS. Por último, se añadió una solución de Azul de Toluidina O (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) al 0,1% en agua bidestilada, se realizó una incubación de 15 min a temperatura ambiente, tras lo cual se retiró la solución de colorante y se realizaron 3 lavados con agua bidestilada.

7.2. ENSAYOS DE FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS DE TIPO CAPILAR

Para determinar la capacidad de formación de estructuras de tipo capilar, propias de las células endoteliales, se procedió a la siembra de las células en medio semisólido constituido por Matrigel en placas de 96 pocillos de fondo plano. El recubrimiento de los pocillos se realizó mediante la adición de 50 μ L de Matrigel a cada pocillo, previamente descongelado a 4°C en un vaso de precipitado con agua. Una vez recubiertos los pocillos, las placas fueron incubadas durante 1 h a 37°C para la gelificación del Matrigel, formándose una capa semisólida de este material de unos pocos milímetros de espesor. Células obtenidas por tripsinización de los cultivos de las diferentes etapas del proceso de obtención de ME-LC a partir de hASC (Etapas I a IV) (ver protocolo detallado en el apartado 2.2.) fueron sembradas a densidades variables entre 5-20 x 10³ células por pocillo en medio EGM-2. Estos cultivos fueron mantenidos

durante 7 días, realizando los cambios de medio necesarios con sumo cuidado para evitar el arrastre del Matrigel y, por consiguiente, de las células crecidas en él. Como control positivo se utilizó el cultivo de células HUVEC en condiciones similares.

La determinación de la formación de estructuras de tipo capilar fue confirmada por la observación de los cultivos mediante microscopía óptica a las 4 h, 24 h y 7 días de cultivo, y fueron tomadas fotos utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM5500 B equipado con el software Leica CW4000. El número de estructuras de tipo capilar fue medido a las 24 h de cultivo en Matrigel, a partir de 3 experimentos independientes, siendo considerada cada porción de cordón entre las ramificaciones como una unidad de cordón capilar. Con los datos obtenidos se realizó una medida semicuantitativa de la formación capilar en Matrigel (índice de formación tubular) usando el cultivo de células HUVEC como control, como ha sido descrito anteriormente en diferentes estudios (Lopes et al., 2009; Soares et al., 2004).

7.3. ENZIMA-INMUNOENSAYO

Para determinar la producción de SDF-1 por las células en los diferentes cultivos del proceso de obtención de ME-LC a partir de hASC (ver protocolo detallado en el apartado 2.2.), se procedió a realizar un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”, ELISA).

Primeramente, el medio de cultivo fue sustituido por el mismo medio utilizado en cada etapa pero carente de suero y otros suplementos, ya que éstos pueden interferir en los resultados del enzima-inmunoensayo. Las células fueron cultivadas en estos medios definidos durante 24 h y, transcurrido este tiempo, se recuperó el sobrenadante de los cultivos, se centrifugó 7 min a 1.500 rpm para descartar los restos celulares y otros artefactos, y se hicieron alícuotas de 500 µL que fueron almacenadas en tubos eppendorf de 1,5 mL a -80°C.

Para este ensayo se utilizó un kit específico para cuantificar el SDF-1 humano (Human SDF-1 Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) que emplea un ELISA tipo sándwich para la detección de esta quimiocina. Este tipo de ELISA está basado en que el anticuerpo específico para SDF-1 se encuentra unido en el fondo de los pocillos

de la placa, por la región constante del anticuerpo. Las muestras y los estándares son pipeteados dentro de los pocillos y el SDF-1 presente queda unido a la placa. Posteriormente, tras varios lavados, se añade un anticuerpo secundario policlonal conjugado con un enzima específico que se une al SDF-1 que haya quedado unido a la placa de ELISA, y mediante la adición del sustrato específico de la enzima se origina un producto que puede ser cuantificado por técnicas colorimétricas.

Para la realización de la curva patrón el kit provee un estándar de SDF-1 que, al reconstituirse con agua bidestilada siguiendo el protocolo indicado, genera una solución stock que contiene una concentración de 10^5 pg/mL de esta quimiocina. Para obtener las diferentes soluciones estándar para la confección de la curva de calibración, se depositan 900 μ L del diluyente RD6Q (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU), suministrado en el kit, en el tubo del estándar de concentración 10.000 pg/mL, y 500 μ L en el resto de tubos. Una vez preparados, se añaden 100 μ L de la solución stock de SDF-1 al tubo del estándar de mayor concentración, 10.000 pg/mL, y seguidamente se realizan diluciones seriadas a partir de ésta como se muestra en la Figura 26, siendo utilizado el diluyente RD6Q como estándar de concentración 0 pg/mL

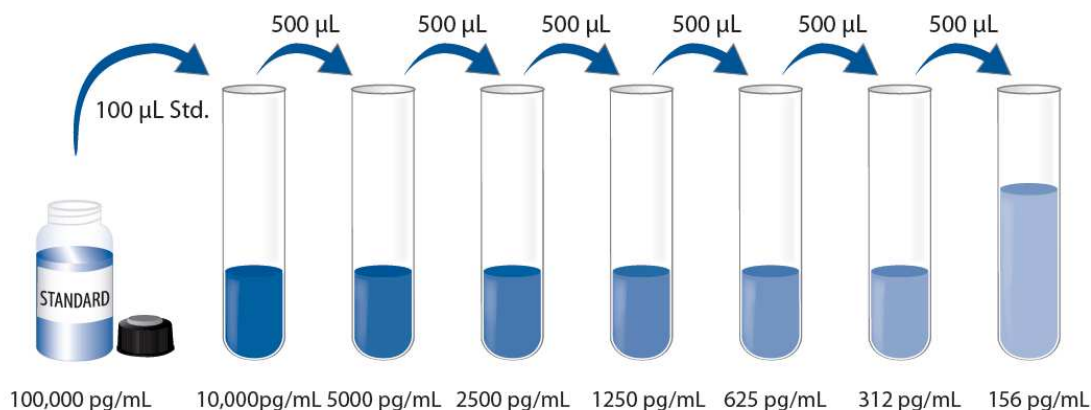


Figura 26. Obtención de las soluciones estándar del factor 1 derivado del estroma (SDF-1)

Una vez preparadas las soluciones estándar, las muestras y los reactivos del kit utilizado fueron mantenidos a temperatura ambiente durante 1 h y, una vez atemperados, se añadieron 100 μ L del diluyente RD1-55 (R&D Systems, Minneapolis,

MN, EEUU) a cada pocillo de la placa. A continuación, se depositaron en los pocillos 100 μL de cada muestra por triplicado, así como de cada estándar por duplicado, para la elaboración de la curva patrón.

Tras una incubación de 2 h a temperatura ambiente en agitación orbital, se aspiraron los pocillos con un aspirador automático (Biotek ELx808, Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany) y se lavaron los pocillos 4 veces, con un volumen de 400 μL del tampón de lavado. Tras el último lavado, se eliminaron los posibles restos de la solución de lavado, mediante agitación con golpeo seco sobre una gasa empapadora. A continuación, se añadieron 200 μL en cada pocillo de la solución conjugada, que contiene un anticuerpo secundario policlonal específico para SDF-1, el cual lleva unido un enzima que da lugar a un producto coloreado al reaccionar con su sustrato, y se realizó una incubación durante 2 h a temperatura ambiente y agitación suave. Tras dicha incubación, se repitieron los lavados 4 veces más y se añadieron 200 μL de solución de sustrato en cada pocillo, incubándose las placas 30 min a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Finalmente se añadieron 50 μL de la solución stop y se procedió a la lectura de la señal emitida a 450 nm, con una corrección de 540 nm, en el lector de absorbancia de microplaca modelo ELx800 (Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany).

7.4. ENSAYOS DE MIGRACIÓN

Para determinar la capacidad de migración de las células ME-LC mediada por diferentes factores de crecimiento como el VEGF o el HGF, o por citoquinas como el SDF-1, se utilizó un ensayo en cámara modificada de Boyden, la cual se compone de dos compartimentos, uno superior y otro inferior, separados por un filtro de polietileno tereftalato de 3 μm de diámetro de poro (Figura 27).

En este estudio fueron empleadas células correspondientes a la Etapa IV del proceso de obtención de ME-LC a partir de hASC (ver protocolo detallado en el apartado 2.2.), cultivadas en frascos de cultivo celular de 25 cm^2 recubiertos de colágeno tipo IV en medio EGM-2. Estas células fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio EBM-2 suplementado con 10% de FBS previamente inactivado. La suspensión celular fue añadida a la parte superior de una cámara de microquimiotaxis de 24 pocillos (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) a una densidad celular de 10^5

céls/pocillo, mientras que en la parte inferior de la cámara se añadió medio EBM-2 suplementado con 50 ng/mL de VEGF, 25 ng/mL de HGF o 100 ng/mL de SDF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) (Figura 27).

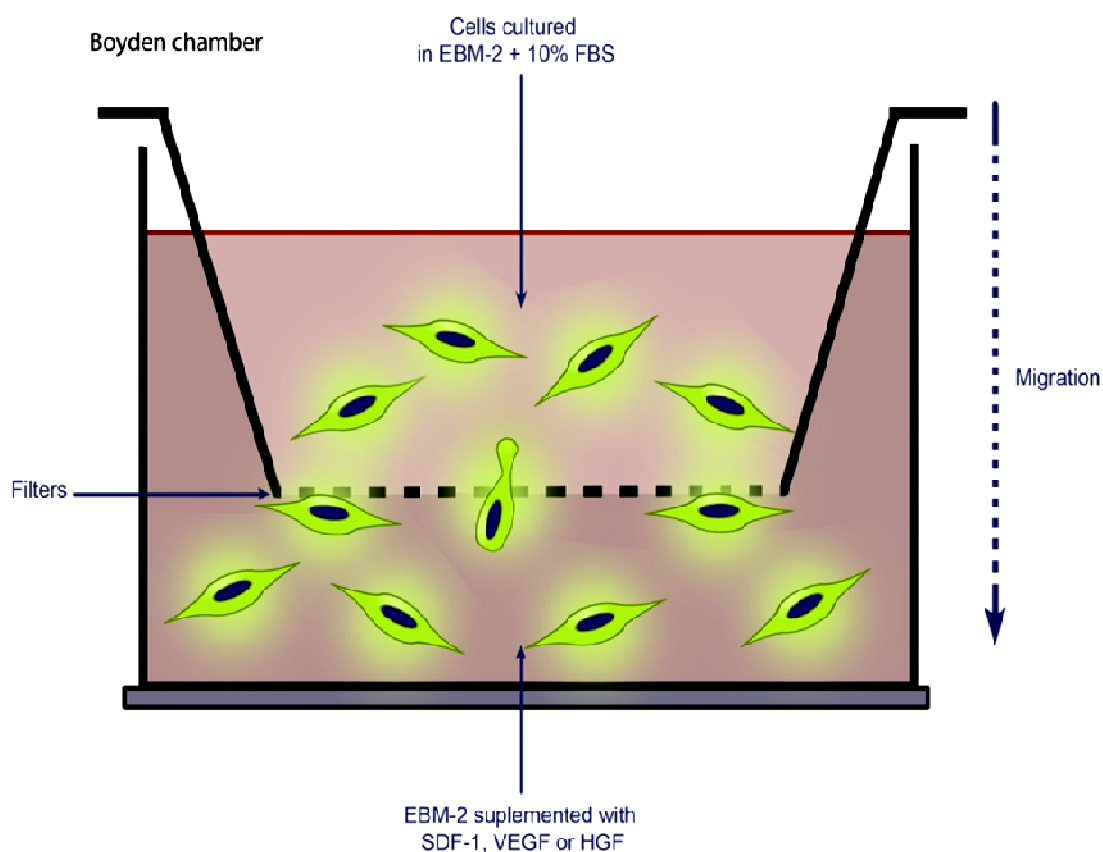


Figura 27. Ensayos de migración en cámara modificada de Boyden

Tras 24 h de cultivo, las células fueron marcadas añadiendo a los pocillos una concentración 5 μ M de calceína-acetoximetil (calceína-AM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), un colorante no fluorescente permeable a la membrana celular que en las células vivas se convierte en un producto de color verde fluorescente, debido a la hidrólisis del éster acetoximetil por las esterasas intracelulares. Las células fueron incubadas durante 1 h a 37°C y, posteriormente, fueron fotografiadas usando un microscopio confocal modelo Leica DMI6000 B equipado con el software Leica MM AF (Leica, Solms, Germany).

7.5. CAPACIDAD DE EXCLUSIÓN DE HOECHST 33342

En este ensayo fueron estudiadas células de la línea MCF-7 de cáncer de mama humano, así como las células obtenidas tras un ciclo de tripsinización sembradas tanto en cultivo adherente como en suspensión (ver protocolo detallado en el apartado 3.2.). Antes de iniciar el ensayo, las células fueron separadas enzimáticamente con Tripsina-EDTA y el pellet celular fue resuspendido en medio DMEM suplementado con 5% de FBS a una concentración de 10^6 céls/mL, en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL. El procedimiento empleado para la tinción con Hoechst 33342 consistió en la adición de éste a la suspensión celular a una concentración final de 5 μ g/mL. En los tubos utilizados como control negativo se añadió inmediatamente una solución de verapamilo, un inhibidor de los transportadores MDR responsables del fenotipo SP, a una concentración final de 50 μ M. Las células fueron incubadas a 37°C durante 90 min, mezclando varias veces la suspensión celular durante la incubación, y seguidamente fueron colocadas a 4°C para impedir el posterior eflujo del colorante. Por último, las células fueron centrifugadas durante 5 min a 1.500 rpm y a 4°C, y se resuspendieron en PBS, previamente enfriado, y traspasadas a tubos de citómetro para su estudio por citometría de flujo.

Para el análisis de las muestras se utilizó un citómetro de flujo analizador y separador celular modelo FACSAria III equipado con el software de adquisición y análisis FACSDiva. Este citómetro consta de un láser de luz UV de 375 nm, que excita al colorante Hoechst 33342 produciendo una emisión de fluorescencia a 450 nm (Hoechst azul) y 675 nm (Hoechst rojo). Para el estudio de las células por citometría de flujo se midió la fluorescencia emitida a 450 nm en el eje vertical y en el eje horizontal la intensidad de fluorescencia a 675 nm, quedando localizadas las células con capacidad de exclusión de Hoechst 33342 en la esquina inferior izquierda del eje de coordenadas, es decir, células que mostraban baja intensidad de fluorescencia a ambas longitudes de onda.

7.6. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ALDEHÍDO DESHIDROGENASA

Para determinar la actividad enzimática ALDH en células cancerígenas se empleó el kit Aldefluor™. Este kit consta de un reactivo fluorescente no tóxico, cuyo espectro de emisión es similar al del FITC, que difunde libremente hacia el interior de

células viables intactas a través de la membrana plasmática, el BODIPY™-aminoacetaldehído (BAAA), un sustrato de la ALDH que es convertido por esta enzima en un compuesto cargado negativamente, el BODIPY™-aminoacetato (BAA), que se acumula en el interior celular gracias a la utilización de un inhibidor de MDR presente en el buffer proveído en el kit, ya que la eliminación de este producto del interior celular es dependiente de este transporte activo. Como control negativo se utiliza un potente inhibidor de la ALDH, el dietilbenzaldehído (DEAB).

El protocolo seguido para este ensayo consistió en el despegue de las células en cultivo enzimáticamente mediante la utilización de Tripsina-EDTA. Las células recolectadas fueron resuspendidas en Aldefluor™ Assay Buffer a una densidad celular de 10^6 céls/mL. Para cada muestra se emplearon 2 tubos de citómetro, uno etiquetado como “tubo prueba” y el otro como “tubo control”, depositándose 1 mL de la suspensión celular en el tubo prueba y 5 μ L de DEAB en el tubo control antes de iniciar el ensayo. Una vez preparados los tubos, se añadieron 5 μ L de una solución 300 μ M de BAAA al tubo prueba, se mezcló vigorosamente con una pipeta e inmediatamente fueron transferidos 500 μ L al tubo control, ya que la reacción enzimática de la ALDH comienza una vez que el sustrato es añadido. Posteriormente, se realizó una incubación de ambos tubos a 37°C durante 45 min y, transcurrido este tiempo, se realizó una centrifugación de 5 min a 250 G, y el pellet celular de cada tubo fue resuspendido en 500 μ L Aldefluor™ Assay Buffer y conservado a 4°C hasta su análisis, para minimizar el eflujo del producto BAA. Por último, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo modelo FACS Canto II equipado con el software de análisis FACSDiva.

7.7. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESFERAS

7.7.1. ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESFERAS

La capacidad de formación de esferas fue ensayada en placas de cultivo de 6 pocillos de baja adherencia (Corning Inc., Corning, NY, EEUU), utilizando un medio de cultivo que permite el mantenimiento de las características de células madre (Dey et al., 2009), compuesto por medio DMEM/F12 (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), suplementado con 1X de B27 (Gibco, Big Cavin, OK, EEUU), 1 μ g/mL de Hidrocortisona, 4 ng/mL de Heparina, 10 μ g/mL de Insulina, 10 ng/mL de EGF, 20

ng/mL de FGF y 1% de Streptomicina-Penicilina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), siendo denominado este medio de cultivo como “Medio de Esferas”,.

Las células empleadas en estos estudios cultivadas en adherencia fueron despegadas enzimáticamente con Tripsina-EDTA y posteriormente lavadas 2 veces con PBS, realizando centrifugaciones de 5 min a 1.500 rpm. El pellet de células fue resuspendido en Medio de Esferas a una concentración de 10^3 céls/mL, tras lo cual fueron sembradas 3×10^3 céls/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos de baja adherencia y cultivadas durante 10 días en estas condiciones, adicionando 500 μ L de medio fresco a cada pocillo cada 2 días. El recuento de las esferas formadas en los pocillos se realizó por triplicado, mediante el estudio de los cultivos tras 10 días por microscopía óptica utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM5500 B equipado con el software Leica CW4000, siendo tomadas imágenes de los cultivos.

7.7.2. ENSAYO DE DILUCIÓN LÍMITE

A partir de las esferas obtenidas siguiendo la metodología descrita anteriormente, se realizó un ensayo de la capacidad de formación de esferas secundarias mediante dilución límite. Para ello, las esferas primarias fueron recuperadas de los pocillos y disgregadas enzimáticamente en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL mediante la adición de 1 mL de Tripsina-EDTA, e incubando en agitación durante 7 min a 37°C. Una vez disgregadas, se añadió DMEM-FBS para detener la acción enzimática de la tripsina y se realizó una centrifugación de 5 min a 1.500 rpm. Posteriormente se realizó un lavado con PBS y el pellet celular fue resuspendido en Medio de Esferas, realizando diluciones seriadas de las células obtenidas en este medio, sembrando 200 μ L/pocillo de cada dilución en placas de cultivo de 96 pocillos de baja adherencia (Corning Inc., Corning, NY, EEUU), cubriendo un rango de densidad celular comprendido entre 100 céls/pocillo y 1 cél/pocillo.

La determinación de la capacidad de formación de esferas secundarias fue estudiada en los pocillos en los que únicamente había sido sembrada una célula, realizando un seguimiento de estos cultivos durante 7 días por microscopía óptica empleando un microscopio de fluorescencia Leica DM5500 B equipado con el software Leica CW4000, añadiendo a los cultivos 25 μ L de Medio de Esferas cada 2 días para el mantenimiento de las células.

7.8. ENSAYO DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO

La capacidad clonogénica fue estudiada en células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano mediante un ensayo de formación de colonias en agar blando. Para ello, se preparó un medio denominado “DMEM-FBS 2X”, compuesto por DMEM carente del indicador de pH rojo fenol (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), para facilitar posteriormente el recuento de las colonias, suplementado con 20% de FBS inactivado y 2% de una solución stock de penicilina y estreptomina. Por otro lado se preparó una solución de agar (Bacto™ Agar, BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) al 1,6% en medio DMEM sin suplementos, y se calentó a 40°C para favorecer la disolución del agar. Posteriormente se diluyó la solución de agar previamente preparada en medio DMEM-FBS 2X en proporción 1:1, obteniendo una solución de agar de concentración 0,8% en medio DMEM-FBS con un contenido del 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomina. Este medio fue depositado con ayuda de una pipeta en placas de cultivo celular de 35 mm de diámetro (Nunc, Rochester, NY, EEUU) a razón de 1,5 mL por placa, manteniendo la solución a 40°C para evitar su solidificación y teniendo especial cuidado de no formar burbujas. Una vez añadida esta base de agar a las placas de cultivo, se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 2 h.

Por otra parte, se preparó una solución de agar al 0,8% en medio DMEM sin suplementos y fue calentada a 40°C para posteriormente ser diluida en proporción 1:1 en medio DMEM-FBS 2X para obtener una solución final de concentración 0,4% de agar en DMEM-FBS. Esta solución fue mantenida a 40°C para mantener su estado líquido hasta su uso. Una vez preparada esta solución con una concentración de agar del 0,4%, las células requeridas para el estudio fueron despegadas enzimáticamente con Tripsina-EDTA y lavadas 2 veces con PBS. El pellet de células fue resuspendido en la solución de agar al 0,4% preparada anteriormente a una concentración de $7,5 \times 10^3$ céls/mL y se depositaron sobre la base de agar 1,5 mL de esta suspensión celular, obteniendo una concentración final de 10^4 céls/placa.

Las células fueron cultivadas durante 3 semanas, añadiendo a las placas 70 μ L de medio DMEM-FBS cada 2 días, siendo suplementado este medio con citoquinas o VEGF en los ensayos realizados con estas proteínas (ver protocolos 4.1. y 4.2.). Transcurrido este tiempo se añadió a los cultivos 1 mL/placa de una solución de 0,05%

de cristal de violeta (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU) preparada en PBS, y se incubaron a temperatura ambiente toda la noche, para facilitar la observación de las colonias. Por último, se realizó un conteo del número de colonias formadas mediante microscopía óptica, utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM5500 B equipado con el software Leica CW4000, procediendo los datos finales obtenidos de ensayos realizados por triplicado.

7.9. ENSAYOS DE TUMORIGÉNESIS *IN VIVO*

7.9.1. ESTUDIOS CON CÉLULAS TUMORALES DE COLON

Para los ensayos *in vivo* con células tumorales de cáncer de colon humanas, se emplearon células de la línea T-84. Un total de 10^4 células de esta línea tumoral antes (grupo control) y después de ser seleccionadas por dos ciclos de tripsinización diferencial (grupo de estudio) (ver protocolo detallado en el apartado 3.2.), fueron inyectadas subcutáneamente en la parte dorsal posterior de ratones NOD/SCID (Charles River, Barcelona, Spain), empleándose un total de 4 ratones para cada grupo. Para ello, las células seleccionadas fueron separadas enzimáticamente con Tripsina-EDTA y resuspendidas a una concentración de 5×10^4 céls/mL en PBS, siendo inyectado a cada ratón un volumen de 200 μ L de la suspensión celular con ayuda de una jeringa de 1 mL con aguja de 16 x 0,5 mm (BD Biosciences, San José, CA, EEUU). Posteriormente, se realizó un seguimiento de los ratones durante 8 semanas, determinándose por palpación la aparición de tumores en la zona de inoculación de las células a las 2 y 8 semanas. Por último, los ratones fueron sacrificados y los tumores formados fueron extirpados y disgregados para su posterior estudio.

7.9.2. ESTUDIOS CON CÉLULAS TUMORALES DE MAMA

Para los ensayos de tumorigénesis *in vivo* con células tumorales de mama humanas, fueron utilizadas células L2G. Para este estudio, células L2G tratadas *in vitro* en cultivos en suspensión con una concentración de 10 ng/mL de VEGF durante 20 h (grupo de estudio) así como células no expuestas a VEGF (grupo control), fueron resuspendidas a una concentración de 10^4 céls/mL en una solución de Matrigel diluido

en PBS a una proporción 1:1, manteniendo en todo momento esta suspensión celular en un vaso de precipitado con hielo para evitar su solidificación. Para cada grupo fueron utilizados 10 ratones NOD/SCID, a los que fueron inyectadas 10^3 céls/ratón en la almohadilla de grasa mamaria de la cuarta mama. Los animales no fueron tratados con VEGF tras la inoculación.

Los estudios de bioluminiscencia a las 0-3-6 semanas para este ensayo fueron realizados mediante un sistema de análisis de imágenes *in vivo* (IVIS) (Xenogen IVIS-200, Caliper Life Sciences Inc., Hopkinton, MA, EEUU). Para ello, los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 20 μ L/ratón de una solución de xilacina-ketamina que contenía 1 mL de una solución stock de clorhidrato de ketamina de concentración 100 mg/mL (Vetalar[®], Parke-Davis, Ann Arbor, MI, EEUU), y 0,5 mL de una solución stock de clorhidrato de xilacina de concentración 20 mg/mL (Rompun[®], Bayer Corporation, Shawnee Mission, KS, EEUU). Para determinar el tamaño tumoral, se inyectó a cada ratón 200 μ L de una solución de D-luciferina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU), sustrato de la luciferasa que al ser metabolizado por esta enzima genera un producto bioluminiscente, de concentración 15 μ g/mL diluida en PBS. Transcurridos 15 min, los ratones anestesiados fueron analizados por IVIS, tomándose imágenes y midiéndose la señal bioluminiscente emitida en fotones/seg, siendo el flujo de fotones del tumor proporcional al número de células vivas que expresaban luciferasa, es decir, al contenido en células tumorales.

Todos los ensayos *in vivo* se realizaron siguiendo las directrices legales y éticas establecidas para la experimentación con animales de laboratorio.

8. RESISTENCIA DIFERENCIAL A FÁRMACOS DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

8.1. EFECTO DE AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

En este estudio células de la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama humano fueron tratadas con Paclitaxel, un agente quimioterapéutico ampliamente empleado clínicamente para el tratamiento del cáncer de mama, así como de otros tipos de cáncer. Para este estudio fueron sembradas células MDA-MB-231 en placas de cultivo

celular de 150 mm de diámetro a una densidad celular de 4×10^6 céls/placa en medio DMEM-FBS y mantenidas 24 h en cultivo para permitir la adherencia de las células a la superficie de cultivo antes de iniciar el tratamiento. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio de cultivo Paclitaxel (Hospira, Chicago, IL, EEUU) a una concentración de 10 nM o 10 μ M. Los cultivos fueron mantenidos durante 8 días en presencia del fármaco, siendo reemplazado el medio cada 2 días. Durante el cultivo se realizaron estudios de proliferación celular, de la distribución del ciclo celular, así como de la proporción de las subpoblaciones CD44⁺/CD24^{neg} y CD44⁺/CD24^{low+} en el cultivo.

8.2. EFECTO DE INHIBIDORES DE LA γ -SECRETASA

Para determinar el efecto del DAPT, un GSI, células de cáncer de mama humano de la línea celular MDA-MB-231 fueron cultivadas en placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro en medio DMEM-FBS suplementado con una concentración 5 μ M de DAPT (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EEUU). Para ello, las células fueron sembradas a una concentración de 10^6 céls/placa y cultivadas en medio DMEM-FBS durante 24 h antes de iniciar el experimento. Tras la adhesión de las células a la superficie de cultivo, se adicionó DAPT a la concentración especificada, realizándose cambios de medio cada 2 días. Las células fueron mantenidas durante 15 días, realizándose estudios de proliferación celular, del ciclo celular y de la proporción en el cultivo de las subpoblaciones CD44⁺/CD24^{neg} y CD44⁺/CD24^{low+}. Para determinar el efecto inhibitorio del DAPT sobre la enzima γ -secretasa se realizaron estudios de Western-Blot para determinar la presencia en las células del receptor NOTCH1 activado (NICD), y también se determinó la expresión de la proteína SOX2.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis de los datos obtenidos en los diferentes ensayos fue realizado utilizando diferentes estadísticos en función de los valores a comparar. Así pues, para el estudio de experimentos independientes, se empleó la prueba H de Kruskal-Wallis, un test no paramétrico que permite determinar si k muestras independientes proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con la misma mediana. Para la comparación de dos medias entre muestras independientes fue utilizado el test paramétrico T de Student cuando los datos obtenidos mostraron una distribución

normal y una varianza homogénea, empleándose el test no paramétrico U de Mann–Whitney cuando estas condiciones no se cumplían. El análisis estadístico fue realizado con el software SPSS 15.0, y los datos fueron representados como la media \pm error estándar (SE), siendo consideradas las diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvieron valores de $p < 0,05$.

RESULTS

1. CHARACTERIZATION OF hASC ISOLATED FROM LIPOASPIRATES

Isolated cells were characterized based on the criteria to define human MSC proposed by “The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” (Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005): i) MSC must be plastic-adherent when maintained in standard culture conditions; ii) MSC must express specific surface antigen; iii) and MSC must differentiate to osteoblasts, adipocytes and chondroblasts *in vitro*. Adipose tissue isolated cells met the standard criteria to identify MSC and were considered as hASC.

1.1. ADHERENCE TO PLASTIC

Cells isolated from human lipoaspirates were maintained in DMEM-FBS medium in T-75 culture flasks. After 24 hours hASC began to adhere to the plastic culture surface, remaining floating cells and debris generated during the cell isolation which were aspirated off (Figure 28). After a few days, cells grew as a monolayer and displayed a fibroblast-like and spindle-shaped morphology (Figure 28). Isolated cells were highly proliferative, with a doubling time of 3.8 ± 0.3 days, and were able to be maintained in culture for >10 weeks with no signs of senescence (Figure 28).

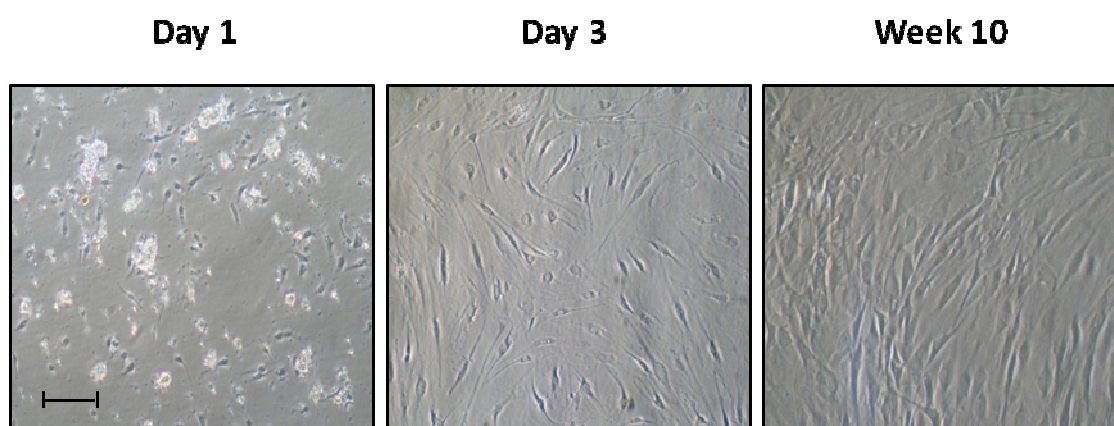


Figure 28. Cellular morphology. Contrast phase microscopy of hASC cultured in adherence in DMEM-FBS medium after 1 day, 3 days and 10 weeks. Scale bar = 200 μm .

1.2. SPECIFIC SURFACE ANTIGEN EXPRESSION

Cells isolated from human adipose tissue and cultured in DMEM-FBS were screened for surface antigens expression of different mesenchymal, hematopoietic and endothelial markers. Characterization by flow cytometry showed that cultured hASC expressed the surface markers CD105 (>99%), CD90 (>90%) and CD73 (>99%) while lacked expression for both hematopoietic and endothelial cell markers CD45, CD34, CD133, CXCR4 and KDR (Figure 29).

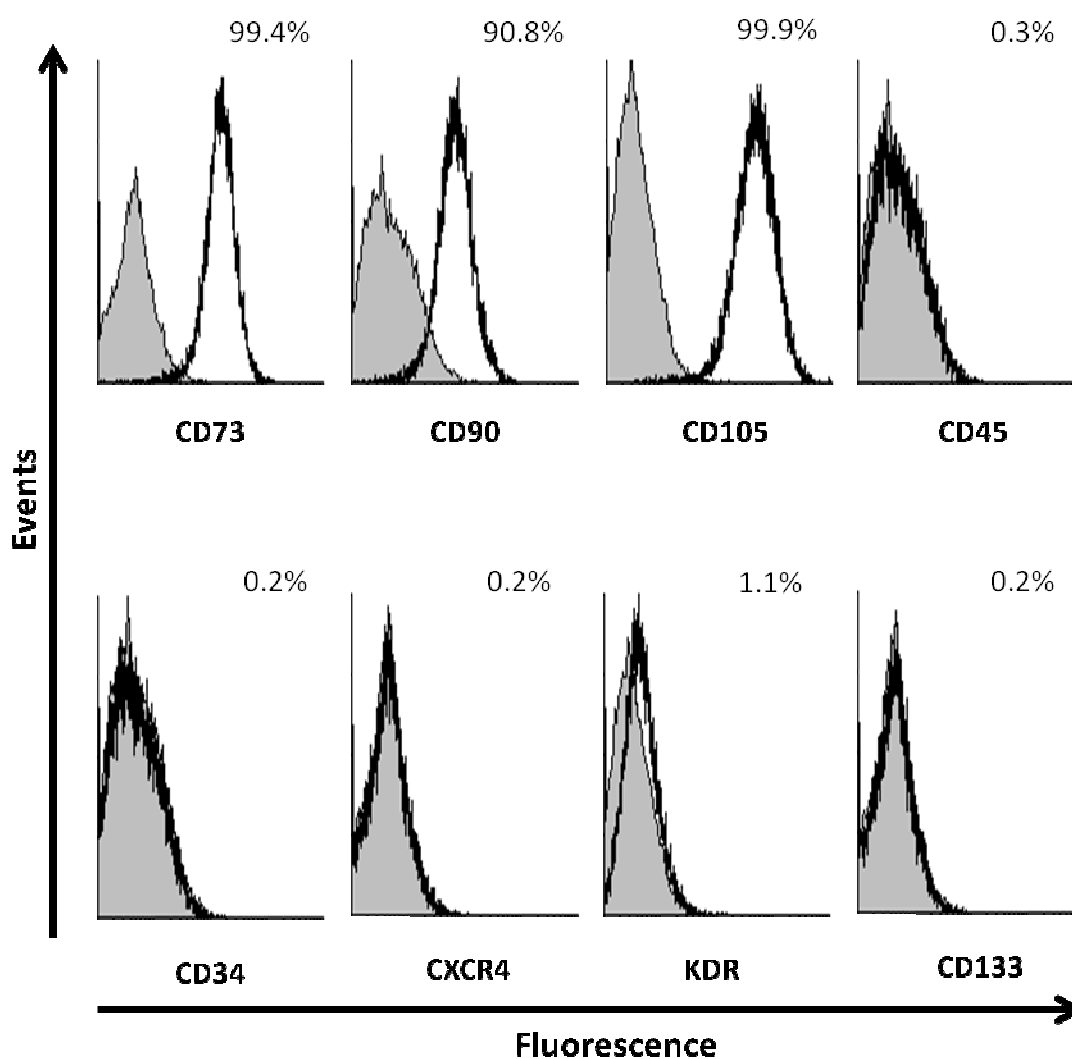


Figure 29. Phenotypic characterization of hASC. Expression of diverse mesenchymal, hematopoietic and endothelial markers in hASC determined by flow cytometry. Grey histograms identify the isotype controls (negative).

1.3. MULTIPOTEENT DIFFERENTIATION POTENTIAL

Isolated cells were able to differentiate into adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages when were cultured under standard *in vitro* differentiating conditions. Cells cultured in adipogenic medium acquired a typical morphology of lipid-laden cells containing intracellular lipid-filled droplets which stained positive for Oil Red O (Figure 30). Alizarin Red S staining demonstrated the osteogenic differentiation, with the presence of mineralized nodules as it is shown in Figure 30, when hASC were cultured in osteogenic medium. Chondrogenic differentiation was confirmed by Toluidine Blue O staining showing accumulation of proteoglycans in the hASC cultures after chondrogenesis induction (Figure 30).

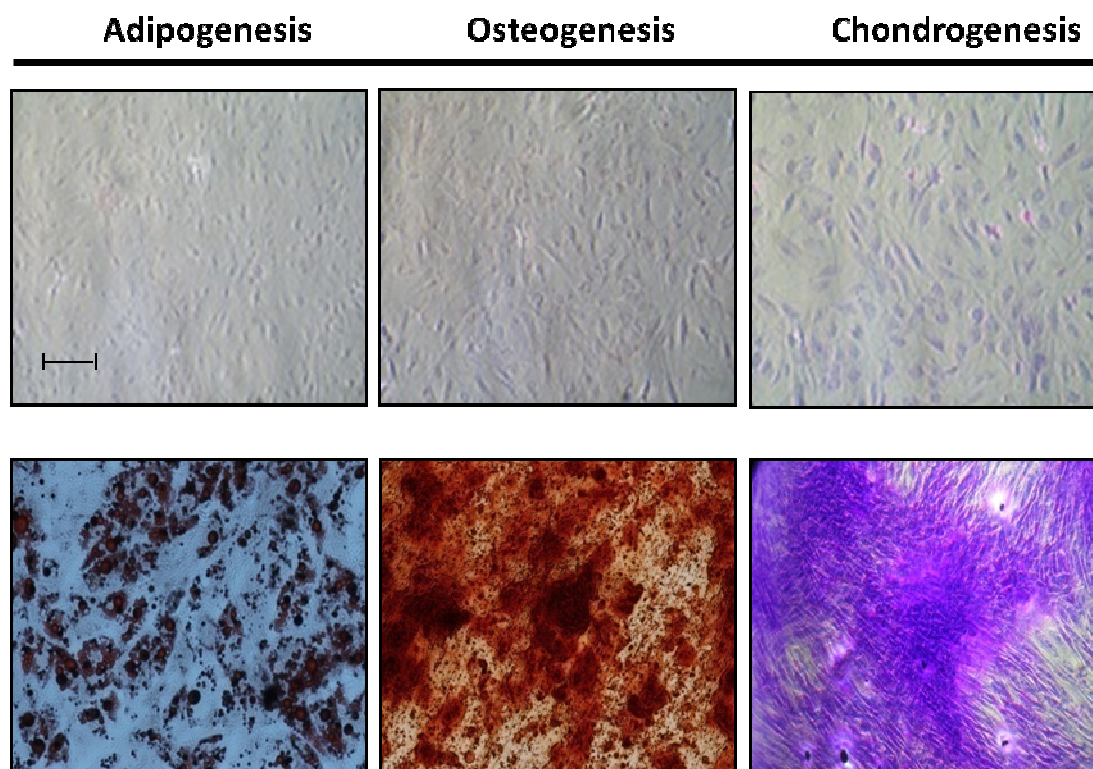


Figure 30. Differentiation potential of hASC. Ability of hASC to differentiate toward adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. Adipogenesis was confirmed by Oil Red O staining, osteogenesis by Alizarin Red S staining and chondrogenesis by Toluidine Blue O staining. Upper pictures show negative controls, hASC cultured in normal medium for 2-3 weeks and then histochemically stained. Scale bar = 200 μ m.

2. ISOLATION AND EXPANSION OF ME-LC FROM hASC CULTURES

2.1. EVOLUTION OF THE CELL CULTURES

ME-LC were isolated through a series of consecutive stages I to IV detailed in the materials and methods section (Figure 23). hASC were maintained in DMEM-FBS for two weeks (Stage I, Figure 31A). On day 14, culture medium was replaced by free serum DMEM and cells began to form three dimensional cellular aggregates, termed SCF, which increased in size over time (Stage II; Figure 31B). After three weeks SCF were harvested and seeded in SFO3 medium in 6 well plates where SCF began to connect each other and showed a variable morphology (Stage III; Figure 31C-D). At the end of stage III (day 35) cells were scraped-off and seeded in a T-25 tissue culture flask coated with collagen type IV in EGM-2 medium. Cells achieved an elongated morphology and grew attached surrounding the SCF (Stage IV; Figure 31E-F). At this stage the doubling time of ME-LC was shorter than hASC, 2.7 ± 0.1 days and 3.8 ± 0.3 days, respectively.

2.2. IMMUNOPHENOTYPE VARIATIONS

Flow cytometry was carried out in each of these culture stages to assess the presence or absence of hematopoietic, endothelial and mesenchymal markers. The expression of the hematopoietic and endothelial markers CD133, CD34, CD45, KDR and CXCR4 significantly varied throughout the isolation process ($P < 0.05$, Mann-Whitney U-test) (Figure 32A). Initially, the cultures were negative for all these markers during stages I and II. When the cells were cultured in SFO3 medium (Stage III), they slightly up-regulated these markers to a some extent: $14.1 \pm 1.7\%$ for CD133, $18.3 \pm 4.9\%$ for CD34, $21 \pm 3.7\%$ for CD45, $27.3 \pm 5.5\%$ for KDR and $13 \pm 1.65\%$ for CXCR4. In stage IV, when the cells had been cultured in EGM-2 medium in collagen IV-coated flasks, the expression of these markers remained but with a significant decrease for all of them except CD45 ($P < 0.05$) (Figure 32A).

High expression levels of the MSC markers CD105, CD73 and CD90 were observed throughout the different stages of the ME-LC isolation procedure (Figure 32B). Although a Mann-Whitney U-test indicates significant differences ($P < 0.05$)

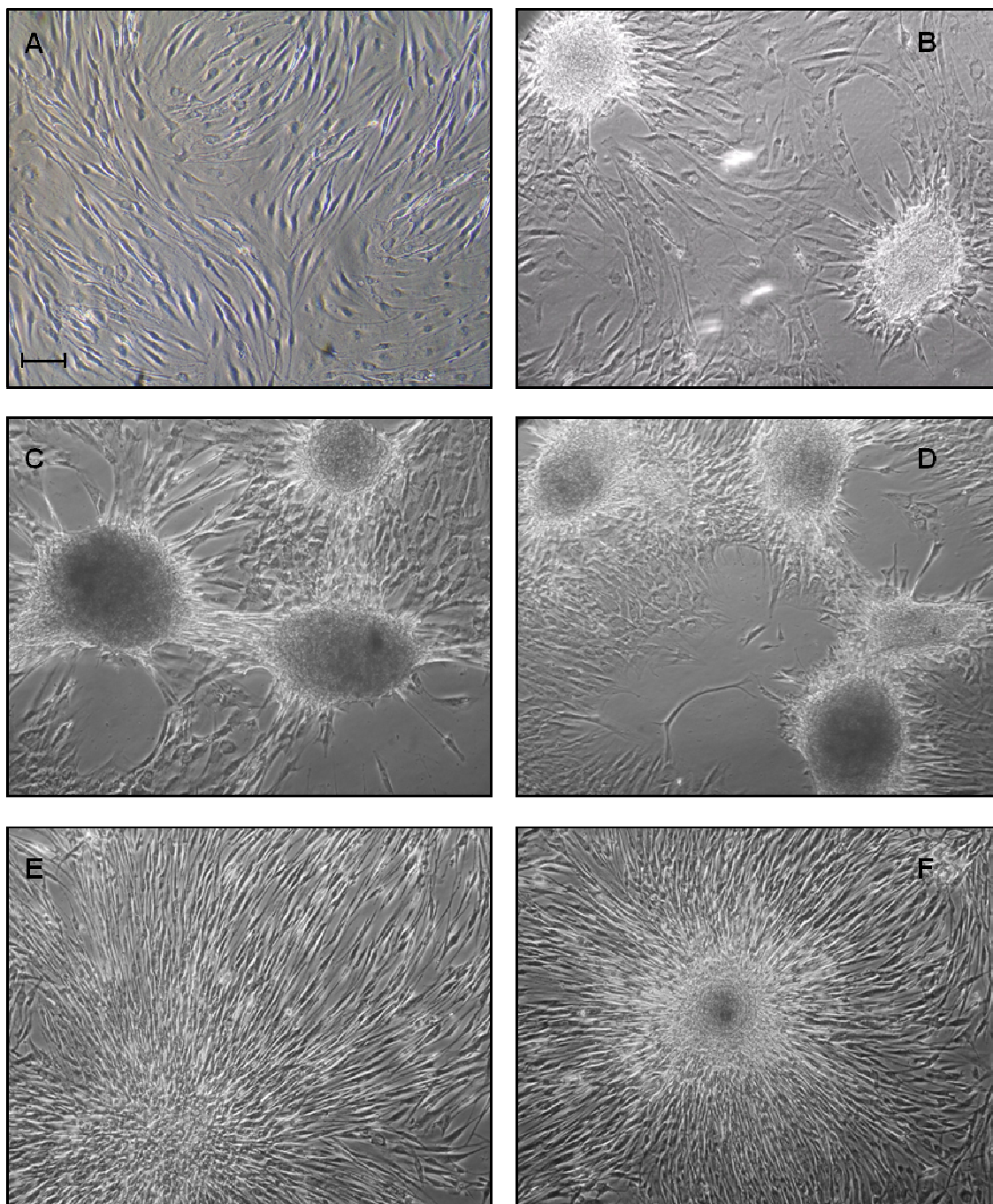


Figure 31. Changes in cellular morphology and distribution in different culture stages. (A) Contrast phase microscopy of cells cultured in DMEM-FBS (Stage I). (B) SCF in serum free DMEM (Stage II). (C, D) Interconnected SCF cultured in SFO3 medium (Stage III). (E, F) Cells cultured in collagen IV-coated flasks in EGM-2 medium (Stage IV). Scale bar = 200 μm .

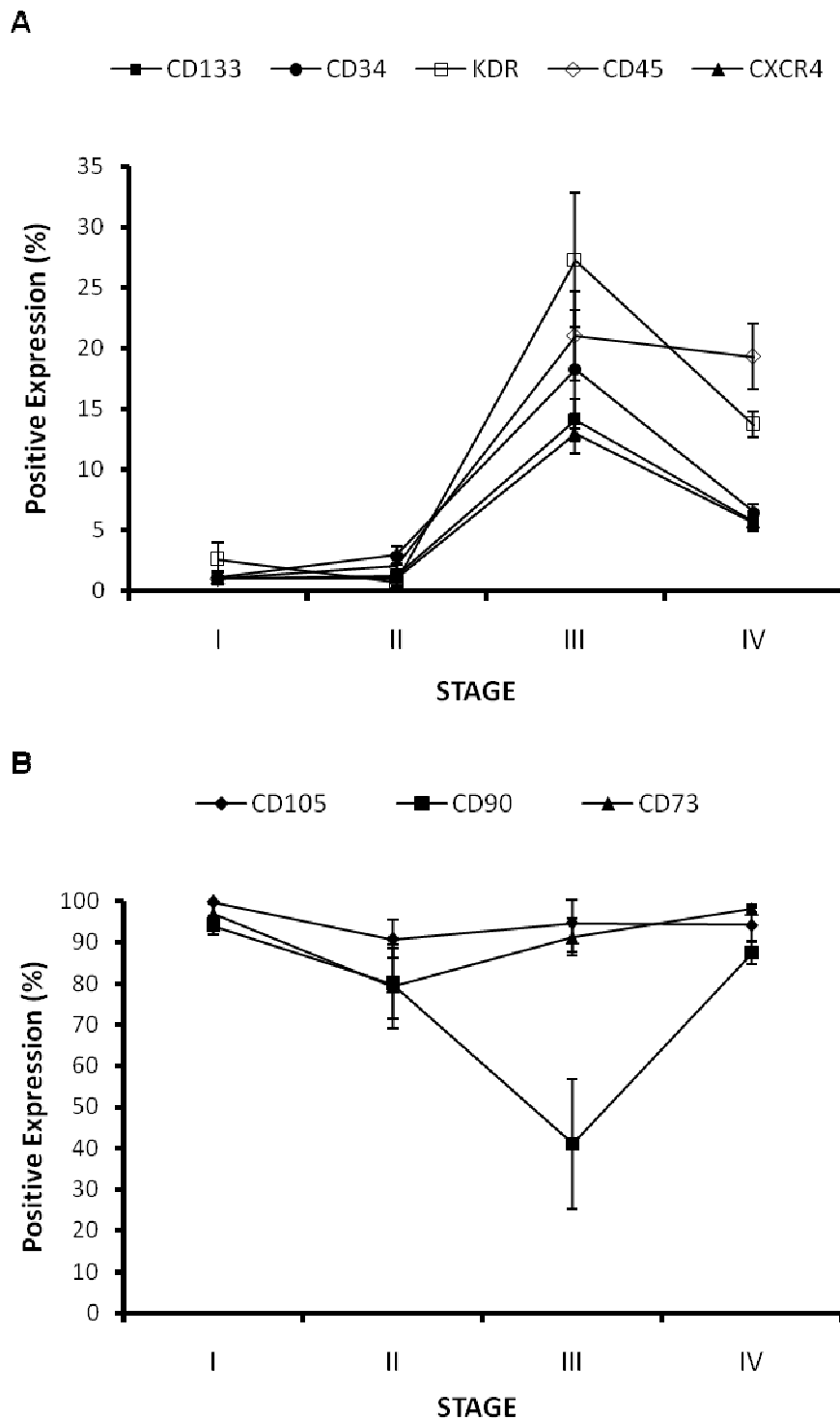


Figure 32. Flow cytometry analysis of endothelial, hematopoietic and mesenchymal markers at different stages. (A) Expression of the hematopoietic and endothelial markers CD133, CD34, KDR, CD45 and CXCR4; and (B) the mesenchymal surface markers CD105, CD73 and CD90 in hASC cultured in different media tested by flow cytometry. All data are expressed as mean \pm SE of four independent experiments performed in triplicate.

among the expression of the three markers. Interestingly, CD90 expression decreased significantly in cells cultured in SFO3 medium (stage III: $41 \pm 15.8\%$) in comparison with cells in the stage I ($94.1 \pm 2.2\%$), stage II (80 ± 8.6) and stage IV ($87.5 \pm 2.7\%$) as it is shown in Figure 32B.

Figure 33 shows a comparison between markers expression of cells at stages I, III and IV versus HUVEC, which were used as control of mature endothelial cells. HUVEC and ME-LC showed expression of CXCR4 and KDR, while CD133 and CD34 were found expressed in ME-LC but not in HUVEC. Expression of the mesenchymal stem cell marker CD90 decreased in both ME-LC cultured in SFO3 and HUVEC as compared with cells at stage I. Finally, the endothelial marker CD31 was highly expressed in mature HUVEC ($63 \pm 11.4\%$) but it was barely expressed in stages I, III and IV (Figure 33).

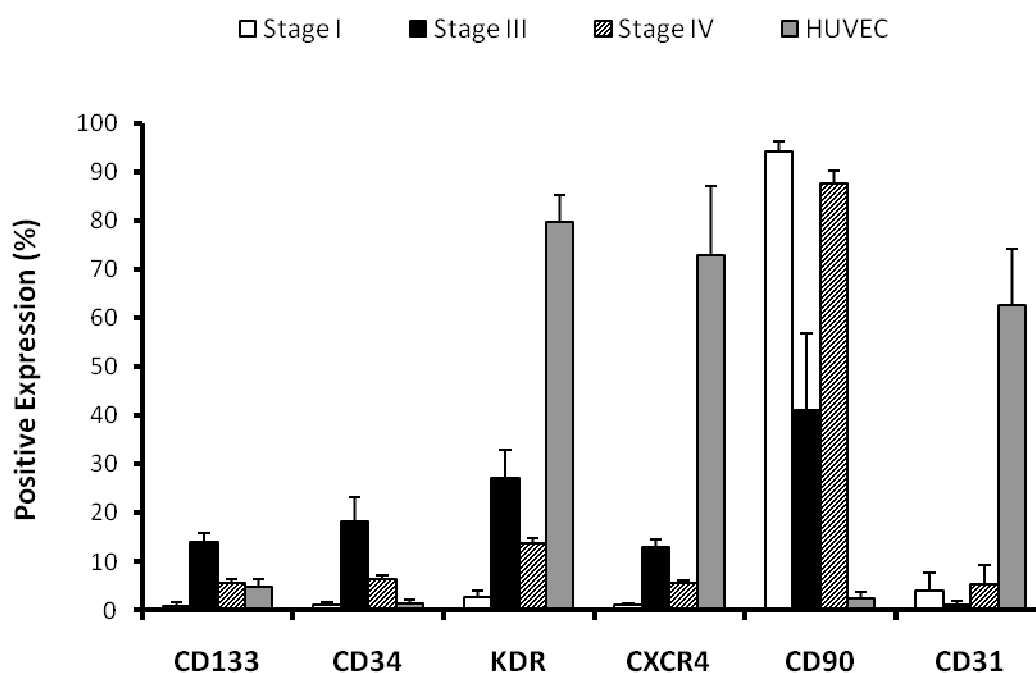


Figure 33. Comparative expression of surface antigens determined by flow cytometry. Expression of CD133, CD34, KDR, CXCR4, CD90 and CD31 in HUVEC (grey bars), ME-LC cultured in EGM-2 (stage IV; striped bars) and SFO3 (stage III; black bars), and hASC cultured in DMEM-FBS (stage I; white bars) determined by flow cytometry. All data are expressed as mean \pm SE of four independent experiments performed in triplicate.

All together, these data suggest that cells obtained from stages III and IV can be considered as ME-LC since they express markers associated with a vascular progenitor phenotype, such as CD133, KDR and CXCR4, but not markers of mature EC, such as CD31.

2.3. GENE EXPRESSION PROFILE AT DIFFERENT STAGES

Expression levels of genes related with EPC were assessed by RT-PCR. Cells cultured from stage I to IV maintained the expression of genes such as *CD133*, *CXCR4* and *FLT1*. A weak expression of *CCR7* and *CDK2* genes was detected in cells at stage III, but they were highly expressed in the other stages of culture (Figure 34).

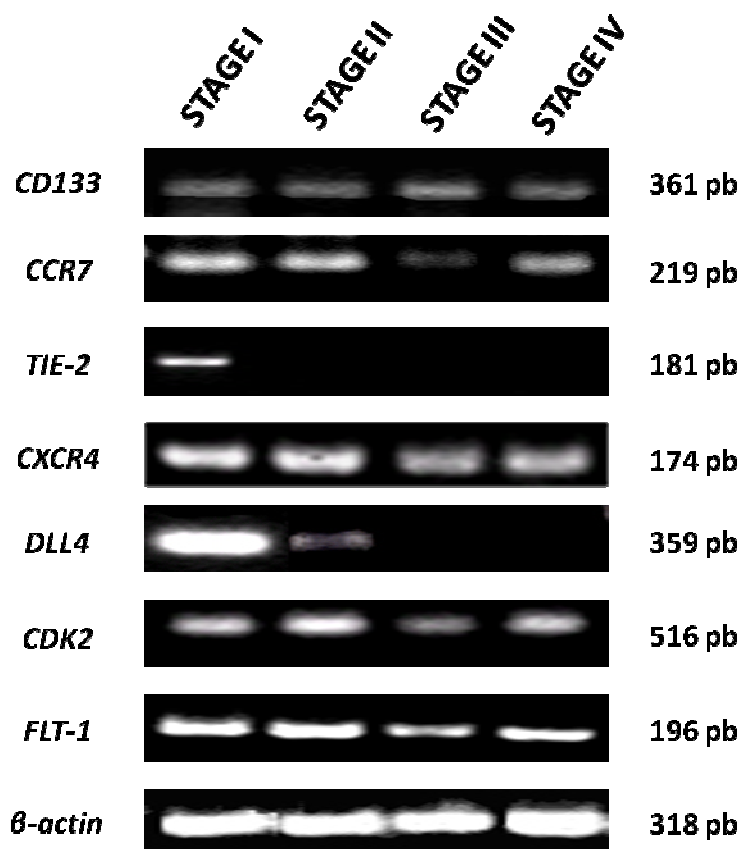


Figure 34. RT-PCR analysis of different genes related with endothelial phenotype throughout ME-LC isolation stages. The expression of *CD133*, *CCR7*, *TIE-2*, *CXCR4*, *DLL4*, *CDK2* and *FLT-1* was evaluated by RT-PCR in cells at different stages (I to IV), using *β-actin* as a housekeeping gene. Experiments were performed in triplicate and were carried out at least twice yielding identical results.

Expression of *TIE2* was only detected at stage I, but not in subsequent stages. Finally, expression of *DLL4* (a Notch ligand) was found highly expressed at stage I. Its expression, however, decreased at from stage II onwards and was completely lost at stages III and IV (Figure 34). These gene expression data suggest the endothelial progenitor phenotype of ME-LC.

2.4. ANGIOGENESIS ASSAY *IN VITRO*

The ability to form capillary-like structures was assessed by culturing cells from each stage (I to IV) on Matrigel™-coated wells and compared with HUVEC used as positive control. As shown in Figure 35, cells from cultures at stage I and II were not able to form any capillaries over a 7 days period. On the other hand, cells previously grown in SFO3 or EGM-2 (stages III and IV, respectively) displayed a large number of capillary-like structures as early as 4 hours after being seeded on Matrigel™, and the appearance of capillary-like structures increased overtime. After 7 days in culture a well-established cellular network was present in all the cultures (Figure 35). HUVEC formed capillary-like structures after 4 and 24 hours in Matrigel™. However, these structures disappeared when HUVEC were cultured for 7 days likely due to their very mature nature (Figure 35). From this result can be concluded that ME-LC enhance functional capillary tubes formation when determined by an *in vitro* angiogenesis assay.

The number of capillary-like structures was counted in every Matrigel™-coated well after 24 hours of culture and a comparative study was developed using HUVEC cultures as control. Cells cultured throughout the distinct stages gradually gained ability to form capillary-like structures ($P < 0.05$) (Figure 36). At stage IV, the number of capillary-like structures formed was similar in comparison with the data rendered by HUVEC (Figure 36).

2.5. SDF-1 LEVELS IN SUPERNATANTS OF CELLULAR CULTURES

2.5.1. SDF-1 SECRETION BY CELLS CULTURED AT DIFFERENT STAGES

The presence of the SDF-1 cytokine in the medium was analyzed by ELISA at different time points. There was a significantly increased of SDF-1 ($P < 0.05$) in

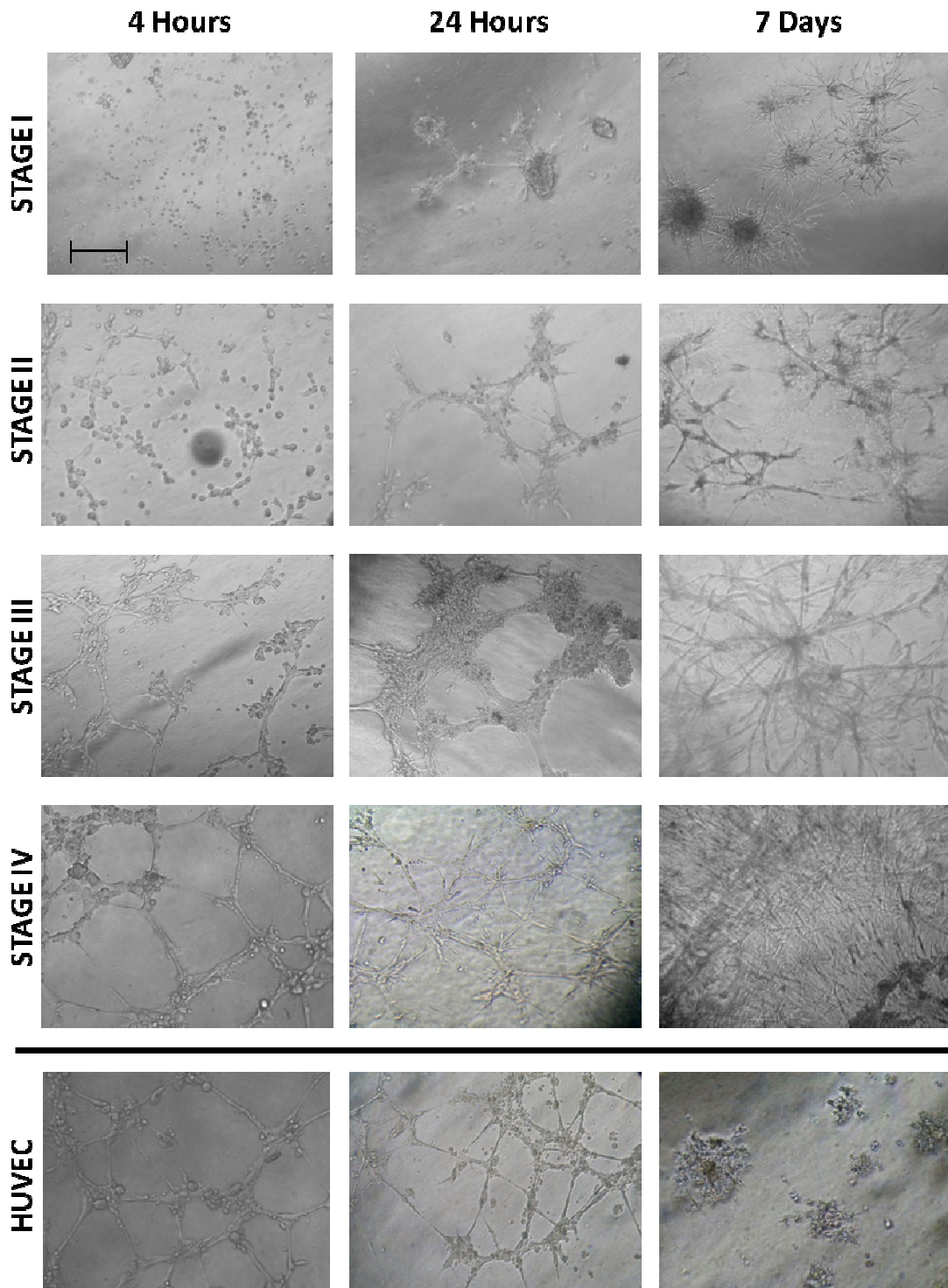


Figure 35. Capillary network formation assay. Representative light microscopy analysis of cells at different culture stages and HUVEC grown on Matrigel™ in EGM-2 medium. Pictures showed were taken at 4 hours, 24 hours and 7 days of culture from one representative experiment of three independent experiments. Scale bar = 200 μm .

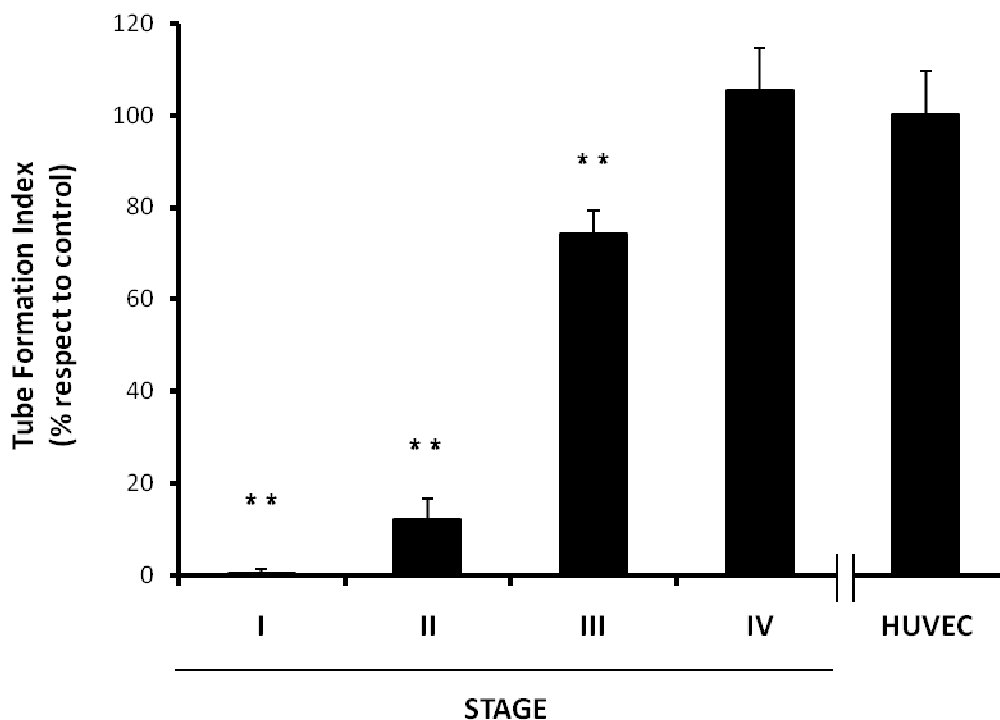


Figure 36. Semi-quantification of the tube formation index. Bars correspond to the percentage of the number of capillary-like structures comparatively to control considered as 100% (HUVEC) measured after 24 hours of culture on Matrigel™. All data were obtained from three independent experiments performed in duplicate and are expressed as mean \pm SE (** $P < 0.05$ vs HUVEC).

supernatants harvested at stage III (583 ± 67 pg/mL) and IV (1420 ± 225 pg/mL) in comparison with the SDF-1 levels at stages I and II (148 ± 20 pg/mL and 148 ± 37 pg/mL, respectively). Moreover, when cells at stage IV were maintained for further 2 weeks in EGM-2 medium, the concentration of SDF-1 increased drastically (4113 ± 170 pg/mL) (Figure 37). These data determine an increased release of the angiogenic cytokine SDF-1 by ME-LC.

2.5.2. INFLUENCE OF ENDOTHELIAL GROWTH FACTORS ON SDF-1 SECRETION BY ME-LC IN AN ECM MODEL

ME-LC were cultured for 2 weeks on Matrigel™-coated plates on EBM-2 medium supplemented with 5% FBS or EGM-2, a medium enriched with different

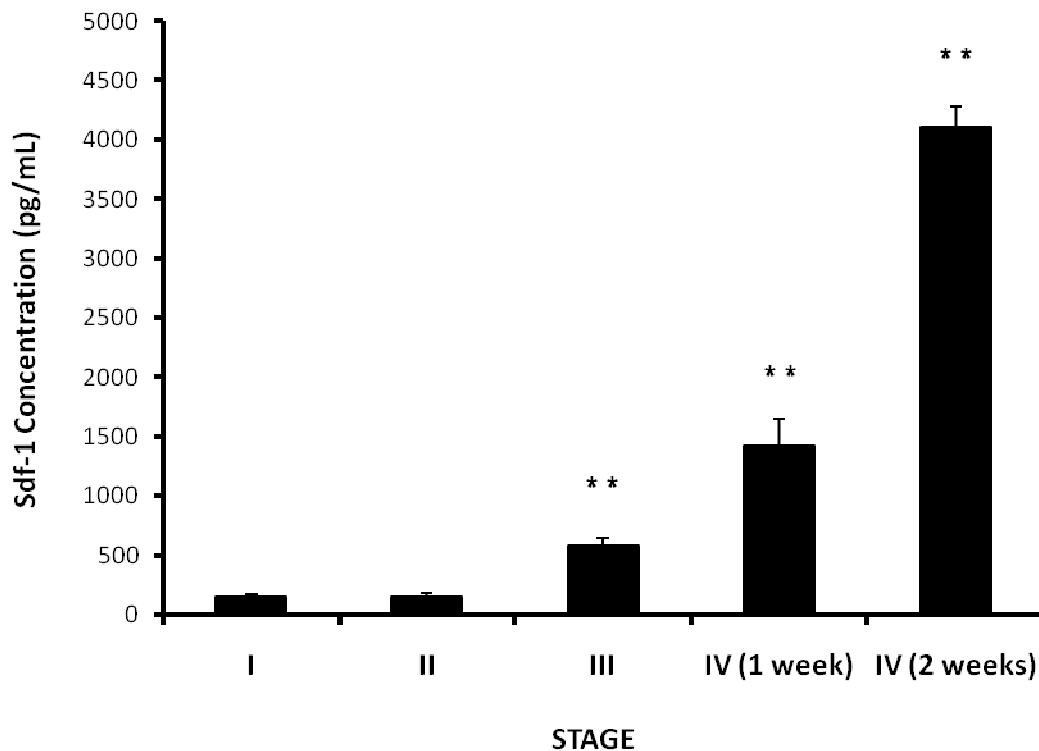


Figure 37. SDF-1 detection in culture supernatants. SDF-1 levels were measured by ELISA in the medium supernatant harvested in different culture stages. All data are expressed as mean \pm SE of four independent experiments performed in duplicate (** $P < 0.05$ vs Stage I).

growth factors such as VEGF, EGF and FGF. Supernatants levels of SDF-1 were 568 ± 40 pg/mL for cells cultured in EGM-2 in comparison with 148 ± 15 pg/mL in cells cultured in EBM-2 supplemented with 5% FBS (Figure 38). Hence, addition of endothelial growth factors to the culture medium increases the secretion of SDF-1 by ME-LC when they are cultured in an ECM of Matrigel™.

2.6. CAPACITY OF ME-LC TO MIGRATE TOWARD ANGIOGENIC CYTOKINES

To investigate the cell migratory response of ME-LC obtained from stage IV towards different angiogenic cytokines such as SDF-1, VEGF and HGF, a modified Boyden chamber was used (see Figure 27 for details). Cells were seeded in the upper compartment in EBM-2 medium supplemented with 10% FBS for 12 hours. The lower compartment contained EBM-2 enriched with SDF-1, VEGF or HGF cytokines. Cells migrated from the upper compartment to the lower compartment through the

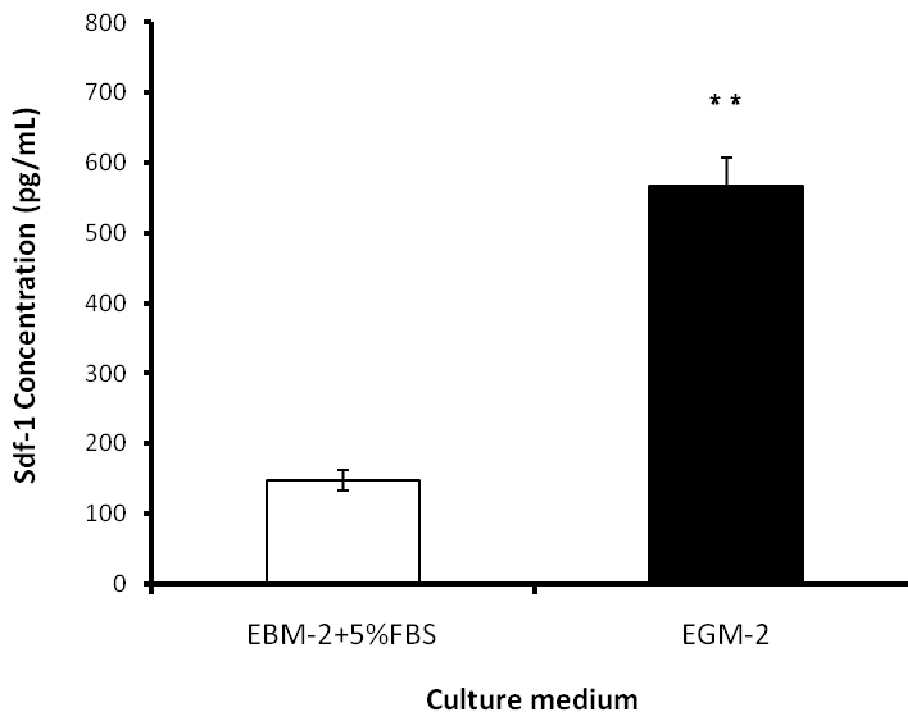


Figure 38. Effect of growth factors in the SDF-1 secretion in an ECM model. SDF-1 concentration released by ME-LC cultured on Matrigel-coated plates grown on EGM-2 medium versus EBM-2 medium supplemented with 5% FBS. Data are expressed as mean \pm SE of four independent experiments performed in duplicate (** P<0.05).

compartment through the pores of the membrane attracted by all the cytokines assessed (Figure 39). The migration capacity induction of ME-LC was determined for each of the chemoattractive agents employed. The migration index was estimated dividing fluorescence data of ME-LC migration toward different cytokines respect to the negative control, which represent ME-LC migration when cytokine-free medium was added into the lower compartment (Figure 39). Data obtained demonstrate that ME-LC were able to migrate in response to angiogenic cytokine stimuli.

3. CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION POTENTIAL OF ME-LC

3.1. EFFECT OF 5-AZA IN THE CELLULAR MORPHOLOGY

The capacity of ME-LC to differentiate into cardiomyocyte-like cells was assessed exposing cells obtained from stages III and IV to 10 μ M to 5-aza at different

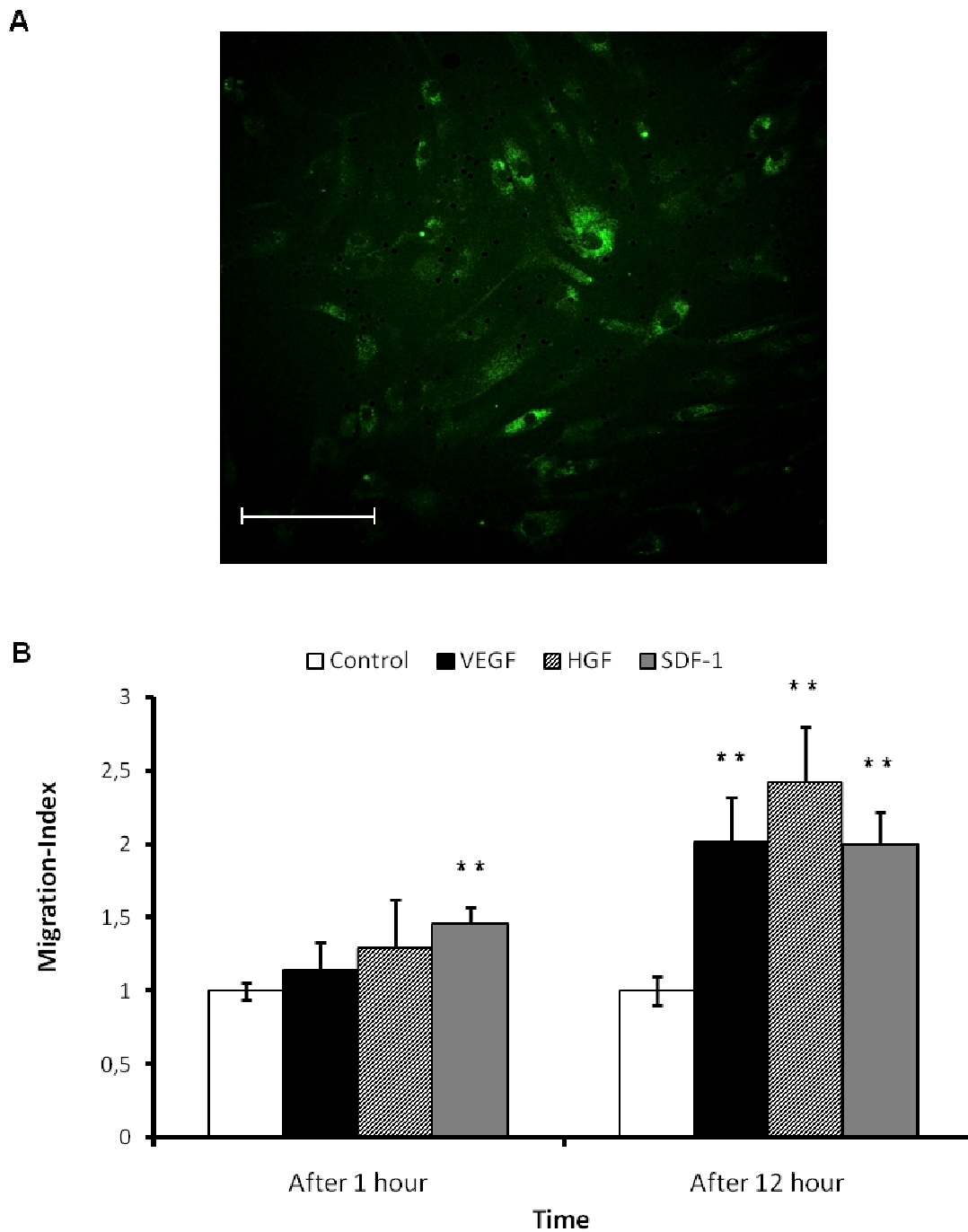


Figure 39. Migration capacity of ME-LC. (A) Confocal microscopy image of calcein AM-labeled cells that migrated through the filter using SDF-1 as chemoattractive cytokine after 12 hours. Scale bar = 100 μ m. (B) Migratory effect of SDF-1, VEGF and HGF in ME-LC after 1 and 12 hours. The migration index was estimated dividing fluorescence data of ME-LC migration toward different cytokines respect to the control, which represent cytokine-free medium. All data are expressed as mean \pm SE of three independent experiments performed in triplicate (** $P < 0.05$ vs the control group).

concentrations and times of incubation. After treatment, ME-LC changed their morphology, getting the best results when they were treated with 10 μ M of 5-aza for 24 hrs. Cells widened and displayed branching fibres easily observed by phase contrast microscopy (Figure 40).

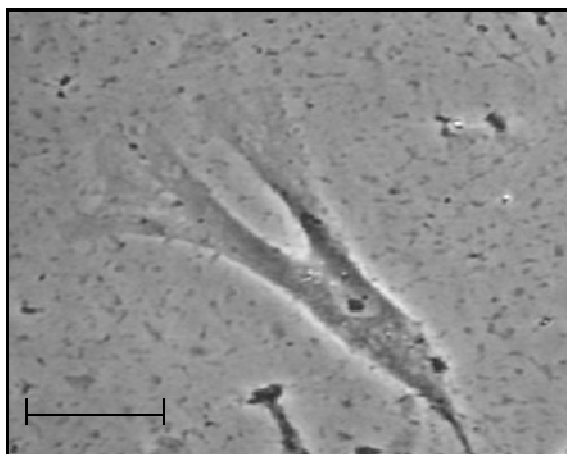


Figure 40. Changes in cell morphology after treatment with 5-aza. Phase contrast microscopy of ME-LC treated with 10 μ M of 5-aza for 24 hours and then cultured in EGM-2 for 3 weeks. Scale bar = 50 μ m.

3.2. CARDIAC MARKERS DETERMINATION ON ME-LC TREATED WITH 5-AZA

3.2.1. IMMUNOFLUORESCENCE STAINING

ME-LC obtained from stages III and IV were exposed to 10 μ M of 5-aza for 24 hrs and cultured for three weeks in EGM-2 medium. Treated cells were fixed and labeled for detection of three typical cardiomyocyte markers. Immunocytochemistry analysis revealed expression of Troponin T, Desmin and α -Actinin in the cytoplasm of the 5-aza treated cells. Interestingly, these cardiac markers colocalized (Figure 41A) and showed a parallel and interconnected distribution with the presence of bi- and multinucleated cells. Control ME-LC non-treated with 5-aza were negative for all the cardiomyocyte markers examined (Figure 41B).

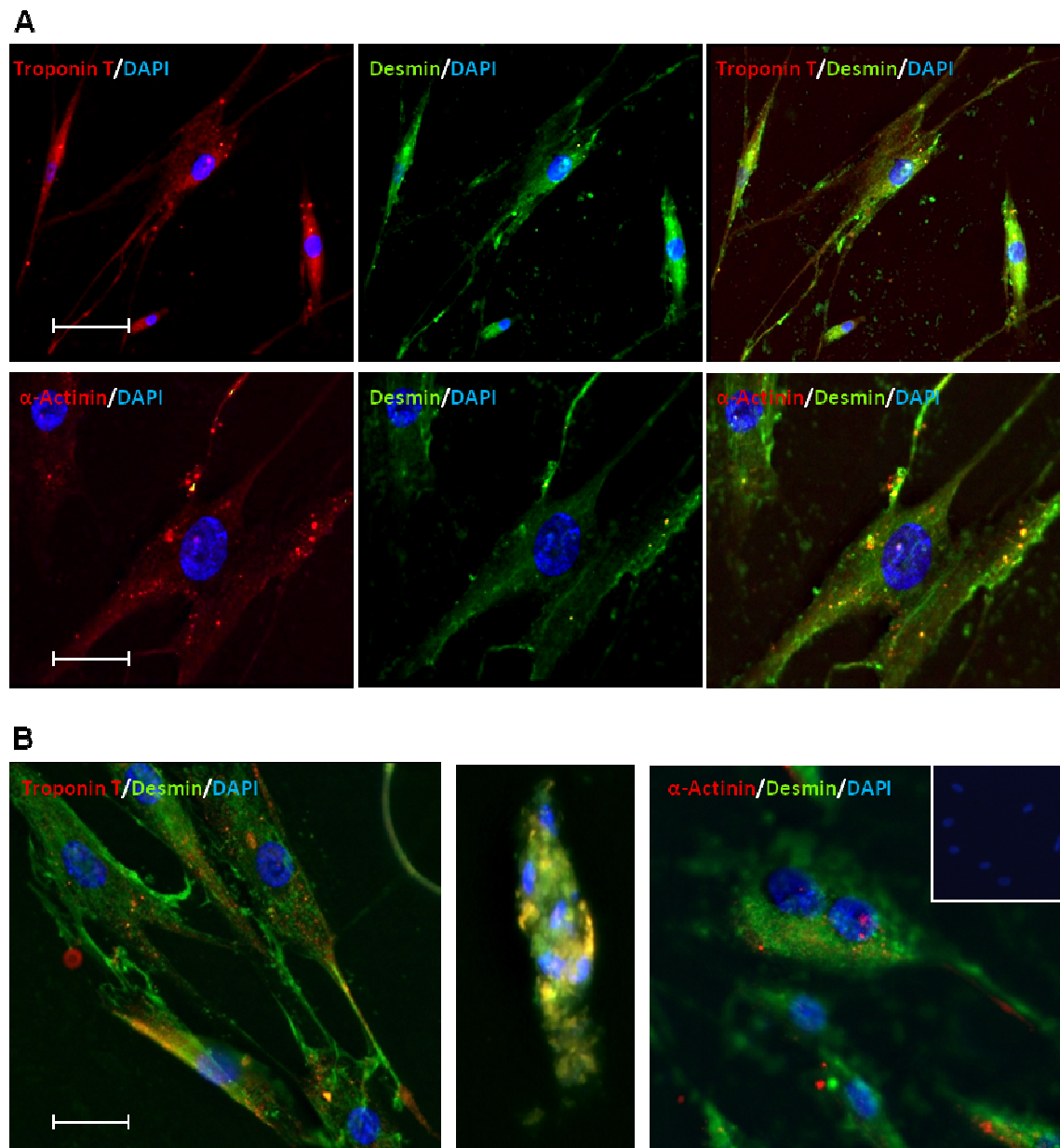


Figure 41. Cardiomyocyte differentiation potential of ME-LC determined by immunofluorescence. (A) Immunofluorescence staining for the expression of cardiac markers in cells cultured in EGM-2 for 3 weeks after induction with 5-aza. Top panels show a double staining for Troponin T-TRICT (red) and Desmin-FITC (green). Scale bar = 100 μ m. Bottom panels show a double staining with α -Actinin-TRICT (red) and Desmin-FITC (green). Scale bar = 50 μ m. (B) Parallel and interconnected distribution of cardiomyocyte-like cells stained with different antibodies displaying the presence of bi and multinucleated cells. The small picture in the upper right corner represents the negative control. Scale bar = 50 μ m. Nuclei are stained with DAPI (blue).

3.2.2. FLOW CYTOMETRY DETERMINATION

The differentiation toward a cardiac phenotype was confirmed by flow cytometry. ME-LC obtained from stage IV cultures exposed to 10 μ M of 5-aza for 24 hours were assessed for the expression of MYL2, Troponin T, Troponin I and Lamin A/C. All markers studied were expressed in cells treated with 5-aza (Figure 42). These results suggest that ME-LC can be directed toward a cardiac phenotype after 5-aza induction.

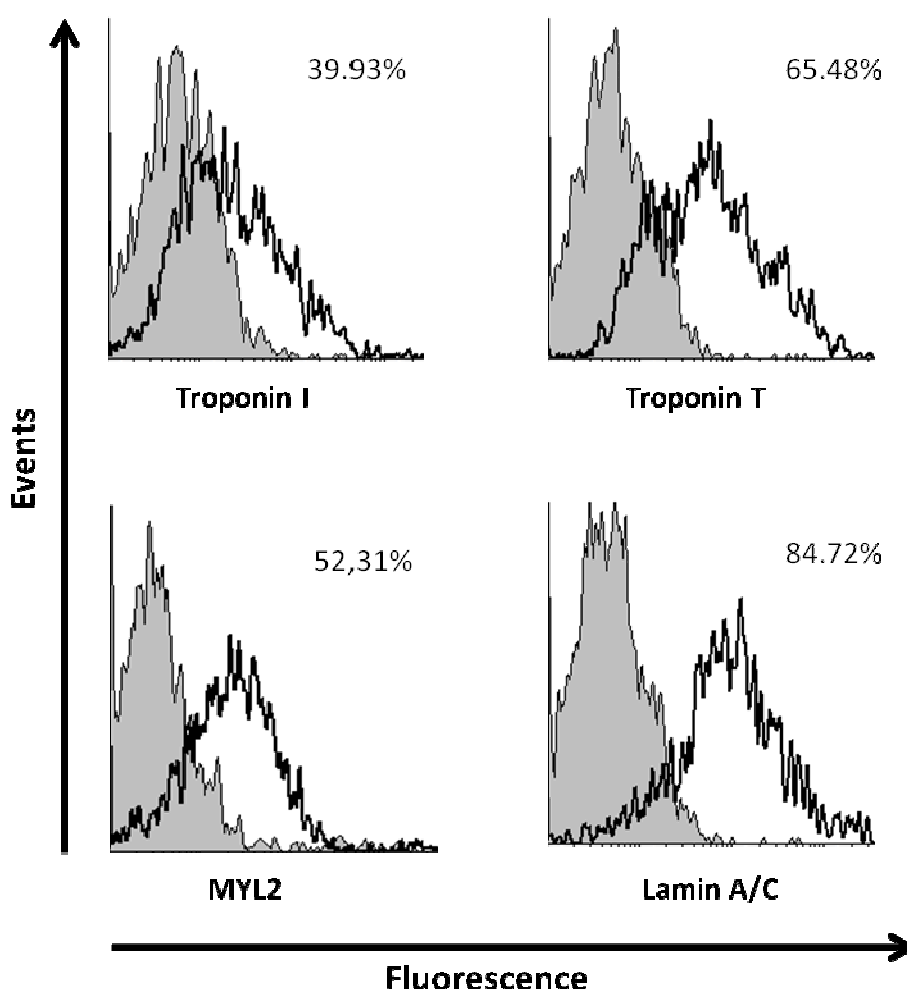


Figure 42. Phenotypic characterization of ME-LC exposed to 5-aza by flow cytometry. Expression of Troponin I, Troponin T, MYL2 and Lamin A/C determined by flow cytometry in ME-LC obtained from stage IV and exposed to 10 μ M of 5-aza for 24 hours and then cultured in EGM-2 for three weeks. Grey histograms identify the isotype controls obtained from cells stained with primary antibodies but using isotype controls as secondary antibodies (negative).

4. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CSC FROM BREAST AND COLON CANCER CELL LINES BY FACS

4.1. CELL ISOLATION FROM THE MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINE BASED ON CD44 AND CD24 EXPRESSION

It has been shown that breast cancer cells with $CD44^+/CD24^{low}/EpCAM^+$ phenotype are enriched in CSC features (Al-Hajj et al., 2003). In order to determine the stemness role of the subpopulations $CD24^{neg}$ and $CD24^{low+}$ we performed a series of studies.

4.1.1. CHARACTERIZATION OF THE MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINE

Before isolation of those two populations, the expression of CD44 and CD24 was assessed by flow cytometry in the triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 cultured in DMEM-FBS medium in T-75 culture flasks (Figure 43). Two different

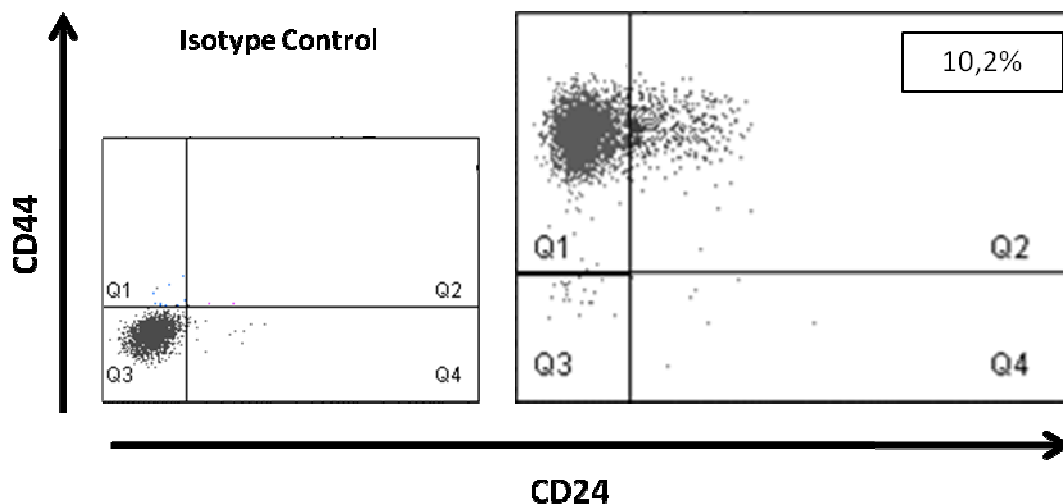


Figure 43. Phenotypic characterization of MDA-MB-231 by flow cytometry. Flow cytometry analysis for CD44 and CD24 expression in the breast cancer cell line MDA-MB-231. Left image represents cells incubated with isotype controls, used to define gate set, and right image cells incubated with specific conjugated antibodies for human CD44 and CD24. Q1 corresponds to $CD44^+/CD24^{neg}$ cells, and Q2 to $CD44^+/CD24^{low+}$ cells.

subpopulations were found with a different expression of the cell surface antigen CD24: i) a major population of CD44⁺/CD24^{neg} cells (>85%); ii) and a minor population with low CD24 positivity or CD44⁺/CD24^{low+} cells (<15%). Failure to stain surface CD24, or CD24-negativity (CD24^{neg}), was defined by the gate set from cells stained with isotype controls (Figure 43).

MDA-MB-231 cells are highly proliferative, doubling the population more than 5 times after 7 days of culture. Hoechst labeling for DNA content and cell cycle profiling of cells gated by CD24 status revealed that both CD44⁺/CD24^{low+} and CD44⁺/CD24^{neg} progenitor populations are actively cycling, with a modest reproducible increase in the percentage S phase of CD44⁺/CD24^{low+} (Figure 44).

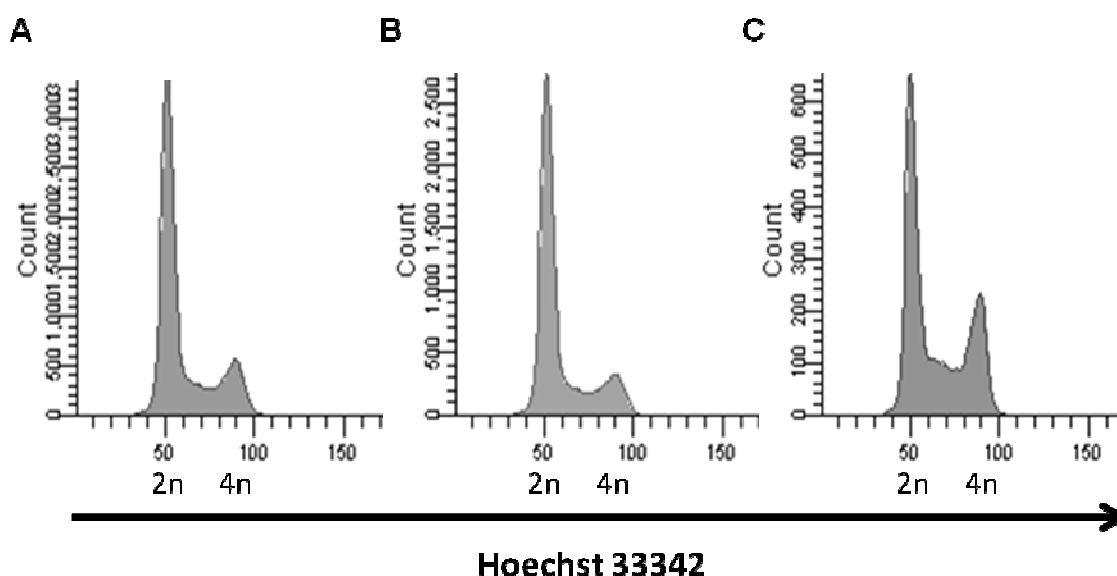


Figure 44. Cell cycle analysis in the total population and in CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} cells. (A) Cell cycle profile in the total population and (B) in the gated subpopulations CD44⁺/CD24^{neg} and (C) CD44⁺/CD24^{low+}, determined with Hoechst 33342 staining by flow cytometry. Left peak in the histograms represents cells in G1 phase (diploid DNA content, 2n), and right peak cells in G2/M phase (tetraploid DNA content, 4n). The space between both peaks corresponds to cells in S phase.

4.1.2. ISOLATION OF CD44⁺/CD24^{neg} AND CD44⁺/CD24^{low+} SUBPOPULATIONS

Previously to carry out FACS, cellular subpopulation CD44⁺/CD24^{low+} was enriched by magnetic sorted with the EasySep™ Human PE Selection Kit, labeling

cells with anti-CD24-PE antibody. The purity obtained after magnetic sorted was >65% for this subpopulation. For CD44⁺/CD24^{neg} subpopulation a primary enrichment was not necessary because the content of this cellular subset in the MDA-MB-231 population is higher than 85%. Both subpopulations were isolated by FACS remained a purity of 98% for CD44⁺/CD24^{low+} and >99% for CD44⁺/CD24^{neg} (Figure 45).

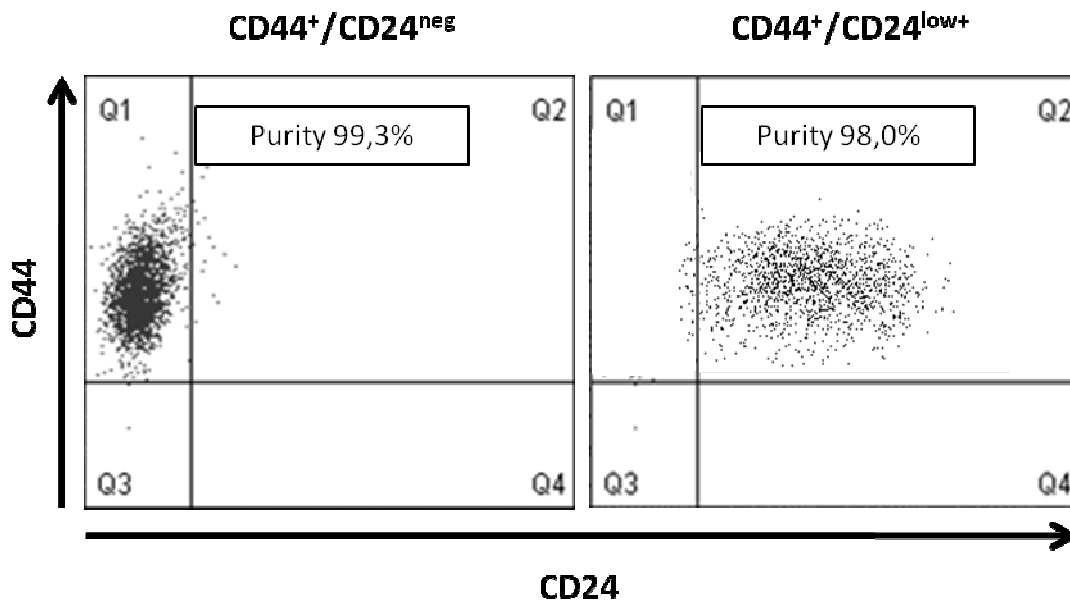


Figure 45. Cell surface expression after cell sorting of CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} cells. Purity of the subpopulations CD44⁺/CD24^{neg} (left) and CD44⁺/CD24^{low+} (right) obtained after FACS and characterized for the expression of CD44 and CD24 by flow cytometry.

4.1.3. CAPACITY TO RECAPITULATE THE INITIAL HETEROGENEITY

To investigate if the greater self-renewal capacity of CD44⁺/CD24^{low+} subpopulations is accompanied by a potential lineage relationship between CD44⁺/CD24^{low+} and CD44⁺/CD24^{neg} populations, each subpopulation was sorted from MDA-MB-231, re-plated and cultured for 8 days. During this time, CD44⁺/CD24^{neg} cells generated only CD44⁺/CD24^{neg} cells (Figure 46A). In contrast, the CD44⁺/CD24^{low+} enriched population (98% purity) gave rise to a population comprised of a majority of CD44⁺/CD24^{neg} (>85%) and a minority of CD44⁺/CD24^{low+} (12,85 ± 2,05%) similar to that observed in unsorted MDA-MB-231 cells (Figure 46B).

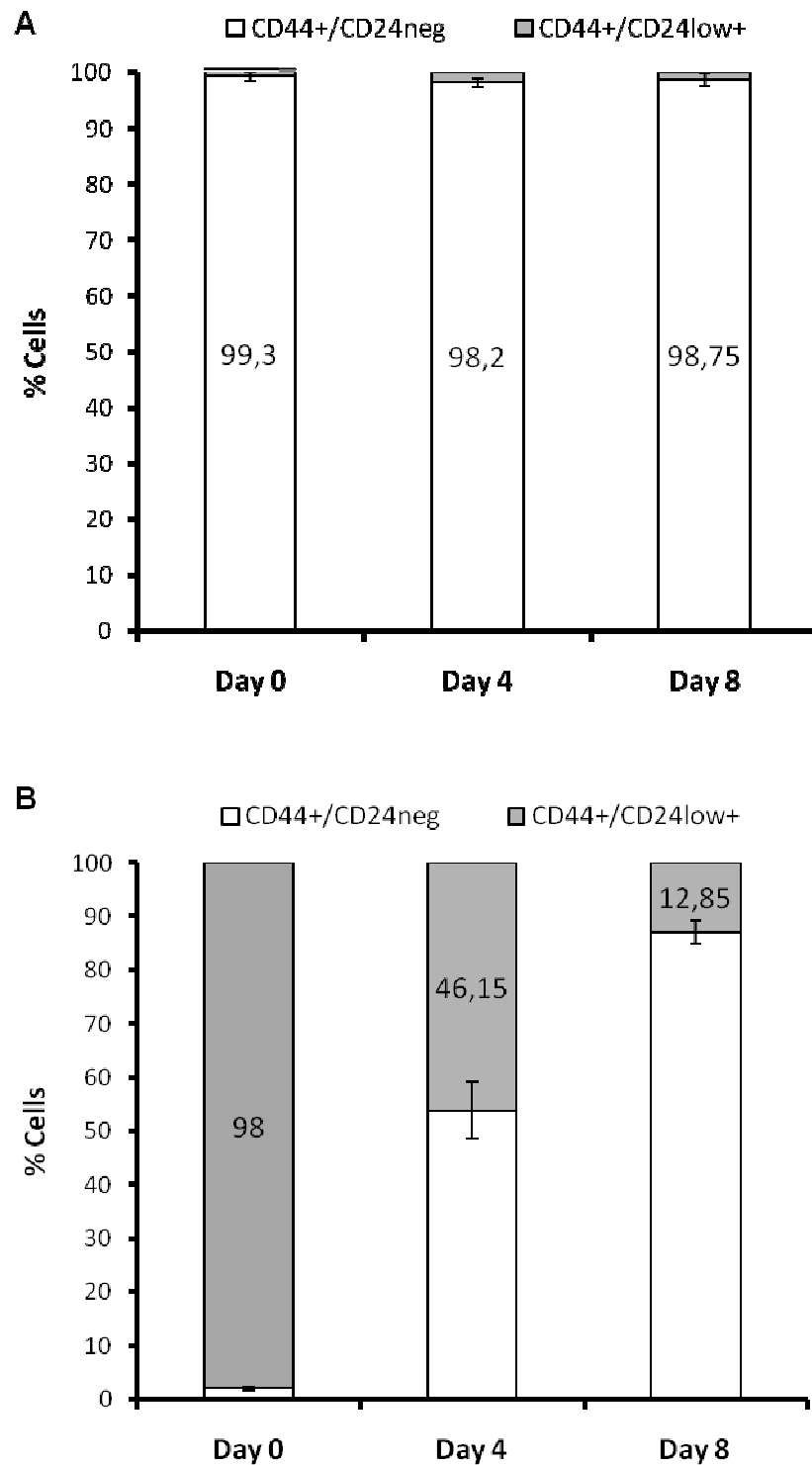


Figure 46. Progeny obtained from sorted CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} subpopulations. (A) Progeny phenotype obtained from sorted CD44⁺/CD24^{neg} and (B) CD44⁺/CD24^{low+} cells determined by flow cytometry.

Cell proliferation curves arising from $1,7 \times 10^5$ cells of each sorted subpopulation showed an identical cumulative increase in cell number over time for progeny of both subgroups, proliferating exponentially and remaining more than $3,7 \times 10^6$ cells after 8 days (Figure 47A). However, the progeny of CD44⁺/CD24^{low+} cells showed two patterns: CD44⁺/CD24^{low+} cell numbers increased gradually and arithmetically but generated exponentially growing CD44⁺/CD24^{neg} progeny (Figure 47B). These data are compatible with a model in which CD44⁺/CD24^{low+} undergo largely semi-conservative replication, with a modest CD44⁺/CD24^{low+} cell expansion resulting from a minor component of symmetric division. The ability of CD44⁺/CD24^{low+} to self-renew and give rise to CD44⁺/CD24^{neg}, while the CD44⁺/CD24^{neg} cells remained phenotypically homogeneous is indicative of a greater tumorigenic potential of the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation

4.1.4. MAMMOSPHERE AND COLONY-FORMATION ASSAYS

A property of CSC is their ability to generate spheres and colonies. Mammosphere and colony formation of CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} subpopulations were assayed after isolation by FACS. While both subpopulations formed mammospheres after 10 days seeding 3.000 cells/well in 6 well plate with Ultra-Low Attachment surface in Spheres Medium, significantly ($P < 0.05$) more mammospheres were generated from equal cell numbers of CD44⁺/CD24^{low+} than CD44⁺/CD24^{neg} cells (Figure 48A). The ability to form colonies in soft agar was also significantly higher ($P < 0.05$) for the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation in comparison with the subpopulation CD44⁺/CD24^{neg} when 10.000 cells were seeded from each one in 35 mm plates and maintained in culture for 3 weeks (Figure 48B). The higher ability to form mammospheres in suspension cultures and the major clonogenicity showed in soft agar by CD44⁺/CD24^{low+} cells, two hallmarks of cancer forming cells, indicate that this subpopulation is more tumorigenic compared to CD44⁺/CD24^{neg}.

. 4.2. CELL ISOLATION FROM THE T-84 COLON CANCER CELL LINE BASED ON ALDH ACTIVITY

A high ALDH activity is associated with normal and malignant SC phenotypes (Ma and Allan, 2011). In this sense we used this characteristic to select CCSC from the colon cancer cell line T-84.

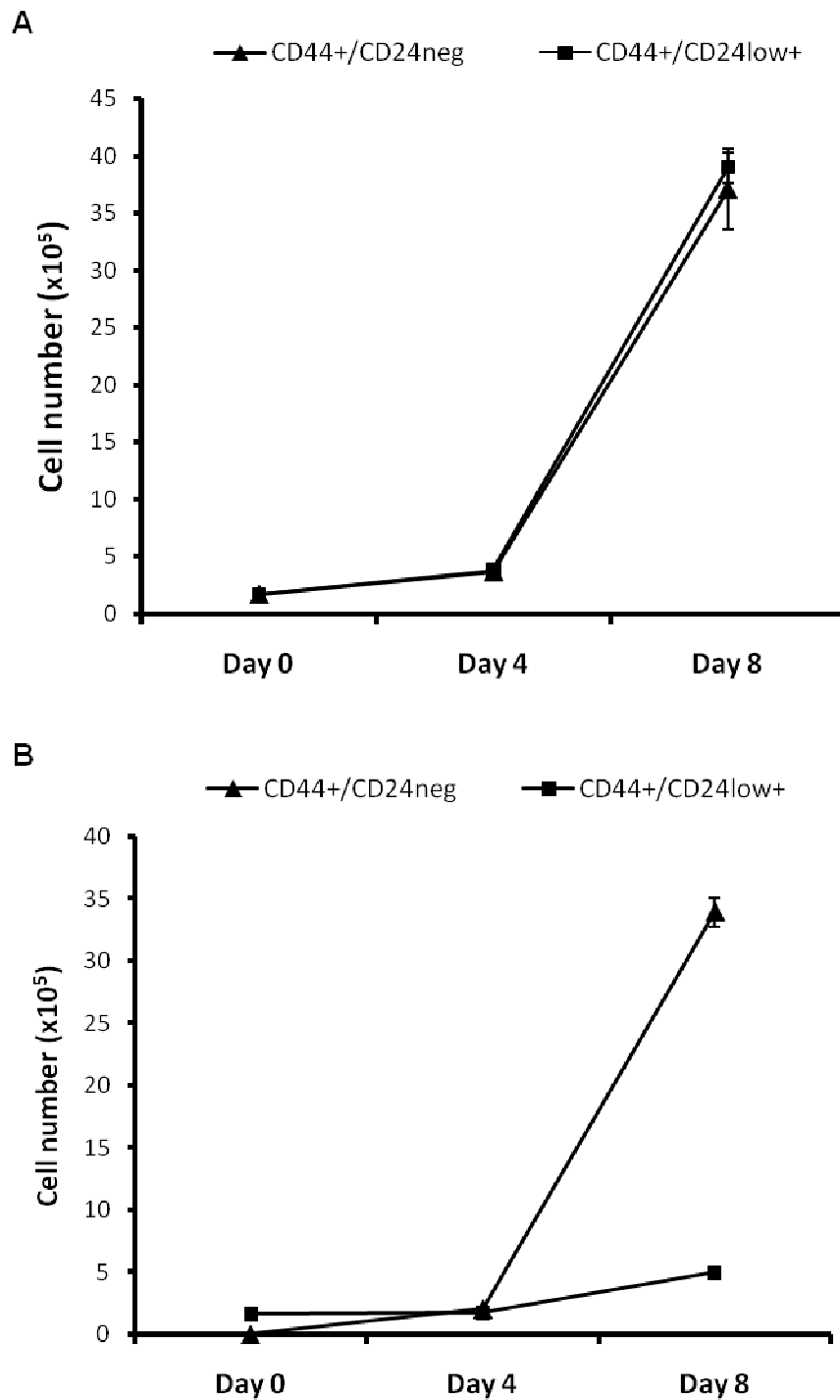


Figure 47. Descent generated from CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} cells sorted from MDA-MB-231. (A) Total number of cells obtained in the cultures of each subpopulation. (B) Number of cells CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} generated in the cultures of the sorted subpopulation CD44⁺/CD24^{low+} starting from a purity of 98%. All data were obtained from three independent experiments performed in duplicate and are expressed as mean \pm SE.

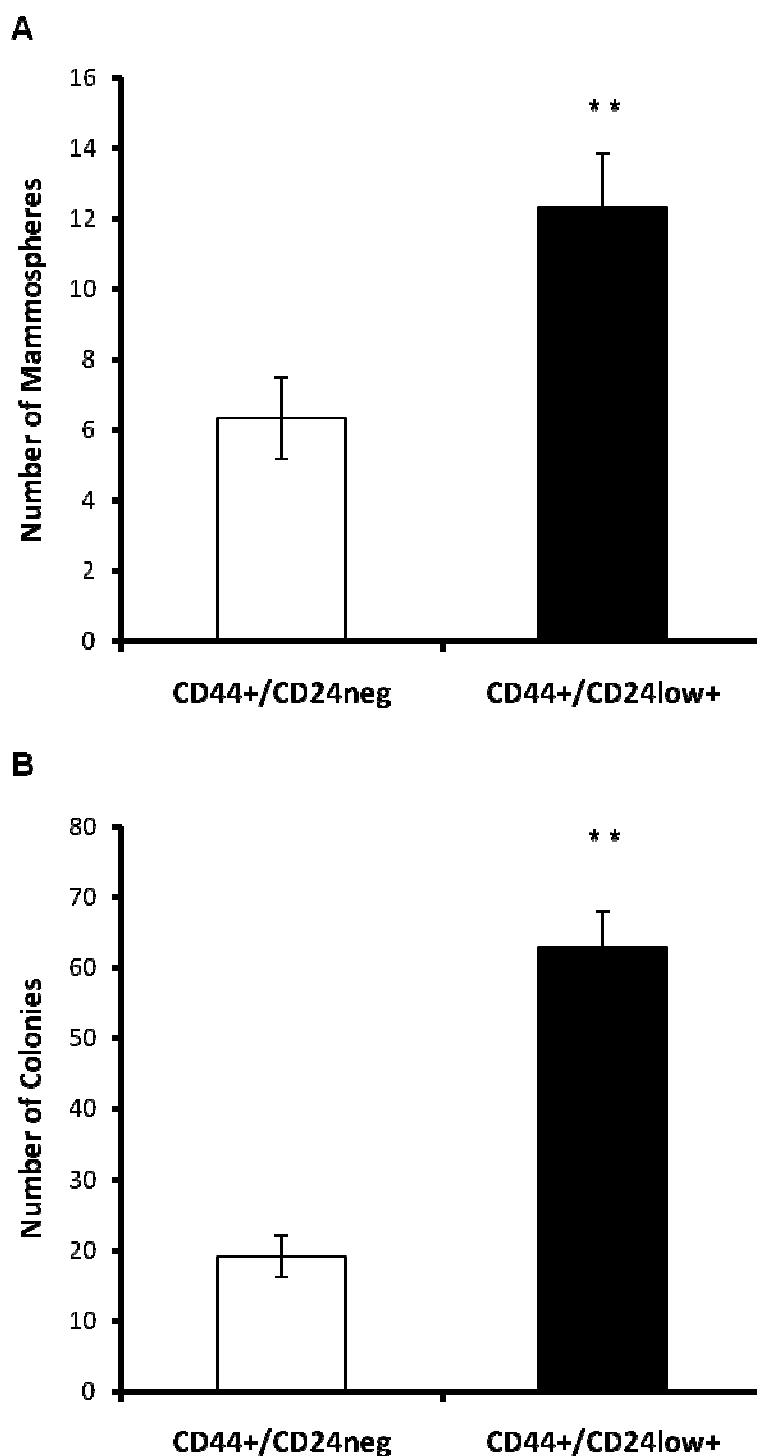


Figure 48. Ability to form spheres and colonies from sorted CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} subpopulations of MDA-MB-231. (A) Number of mammospheres and (B) colonies generated seeding equal numbers of cells of each subpopulation previously isolated by FACS. All data were obtained from two independent experiments performed in duplicate and are expressed as mean \pm SE (** P<0.05).

4.2.1. SORTER FOR LOW AND HIGH ALDH ACTIVITY

The percentage of cells ALDH⁺ in the colon cancer cell line T-84 was determined by flow cytometry using the Aldefluor™ kit. T-84 contained a major population of ALDH⁻ cells (>85%) and a minor population of cells with high ALDH activity (<15%) (Figure 49). These two different subpopulations were isolated by FACS obtaining a purity of 99,8% for the ALDH⁺ subpopulation and 86,9% for the ALDH⁻ subpopulation (Figure 49).

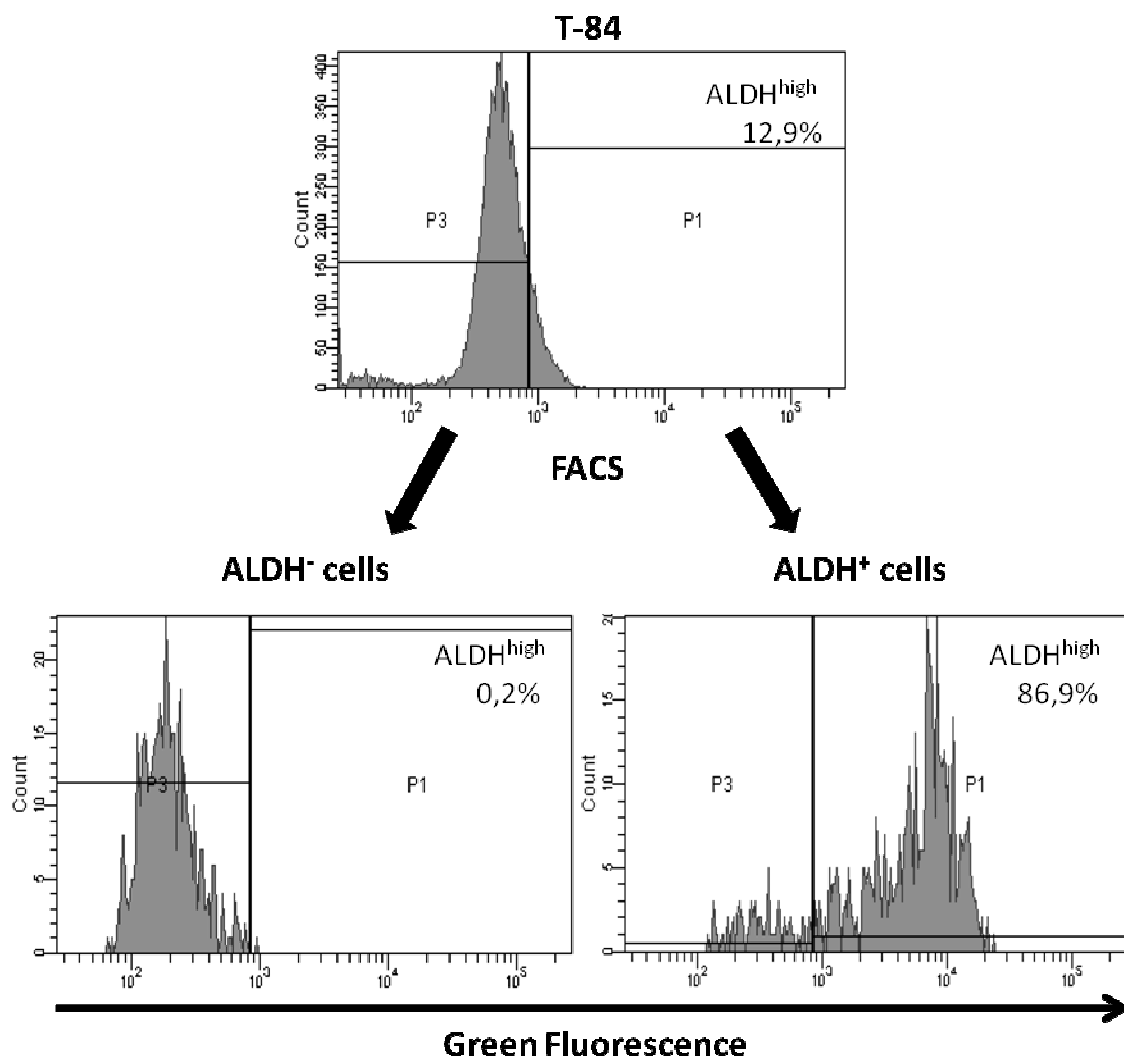


Figure 49. ALDH activity in T-84 cells before and after sorter. Flow cytometry study for the percentage of cells with high ALDH activity in the colon cancer cell line T-84 (upper image) and after the isolation of the ALDH⁻ (bottom left image) and ALDH⁺ (bottom right image) subpopulations by FACS.

To test the period of time that the isolated subpopulations maintain those ALDH activity characteristics, the sorted and unsorted populations were cultured in plates with Ultra-Low Attachment surface in Spheres Medium. After 15 days in culture under the conditions specified the purity of the subpopulations isolated began to decrease, from 99,8% to 96,5% for the ALDH⁻ subpopulation and from 89,6% to 81,4% for the ALDH⁺ subpopulation. Thus we established 15 days as the maximum period for preserve the characteristics of the subpopulations isolated.

4.2.2. CHARACTERIZATION OF CELLS BY FLOW CYTOMETRY

CCSC are usually characterized for the positive expression of different cell surface markers such as CD133, CD44 and CD326 (EpCAM or ESA) (Dalerba et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Cells cultured for 10 days in plates with Ultra-Low Attachment surface in Spheres Medium were phenotypically characterized for the expression of these cellular antigens specified and for the ALDH activity. T-84 cells cultured in T-75 culture flasks in DMEM-FBS medium were used as control.

T-84 cells cultured under standard conditions (control) showed a lack of expression of CD133, CD44 and EpCAM, and a low ALDH activity, with only a $11 \pm 1,95\%$ of cells with high ALDH activity (Figure 50). When these cells were cultured as colonospheres showed an increase in the percentage of ALDH⁺ cells and a high expression of CD133 and CD44, which were not detected in the control culture, but no significant differences were found in regard to EpCAM expression ($P < 0.05$) (Figure 50). Moreover, cells expressing CD133 were also ALDH⁺ (Figure 50).

When T-84 cells were sorted previously based on ALDH activity, the subpopulation ALDH⁺ showed an increased expression of CD133 and CD44 respect to the unsorted population, and in addition EpCAM was only highly expressed ($53,25 \pm 5,87\%$) in this population (Figure 50). Interestingly, when the association between ALDH activity and cell surface markers expression was studied, a similar percentage of cells that expressed CD133 showed also a high ALDH activity, and the same was observed for CD44 and EpCAM (Figure 50). CD133 and CD44 expression was also detected in ALDH⁻ subpopulation, although the increment observed in these cultures

was lower than in the unsorted population cultured under the same conditions ($P < 0.05$) (Figure 50).

In brief, these results show that T-84 cells maintained in colonosphere culture conditions increase the percentage of cells with high ALDH activity and with CCSC cell surface markers expression. In addition, cells previously sorted for high ALDH activity present an increased expression of these surface markers associated with a CCSC phenotype.

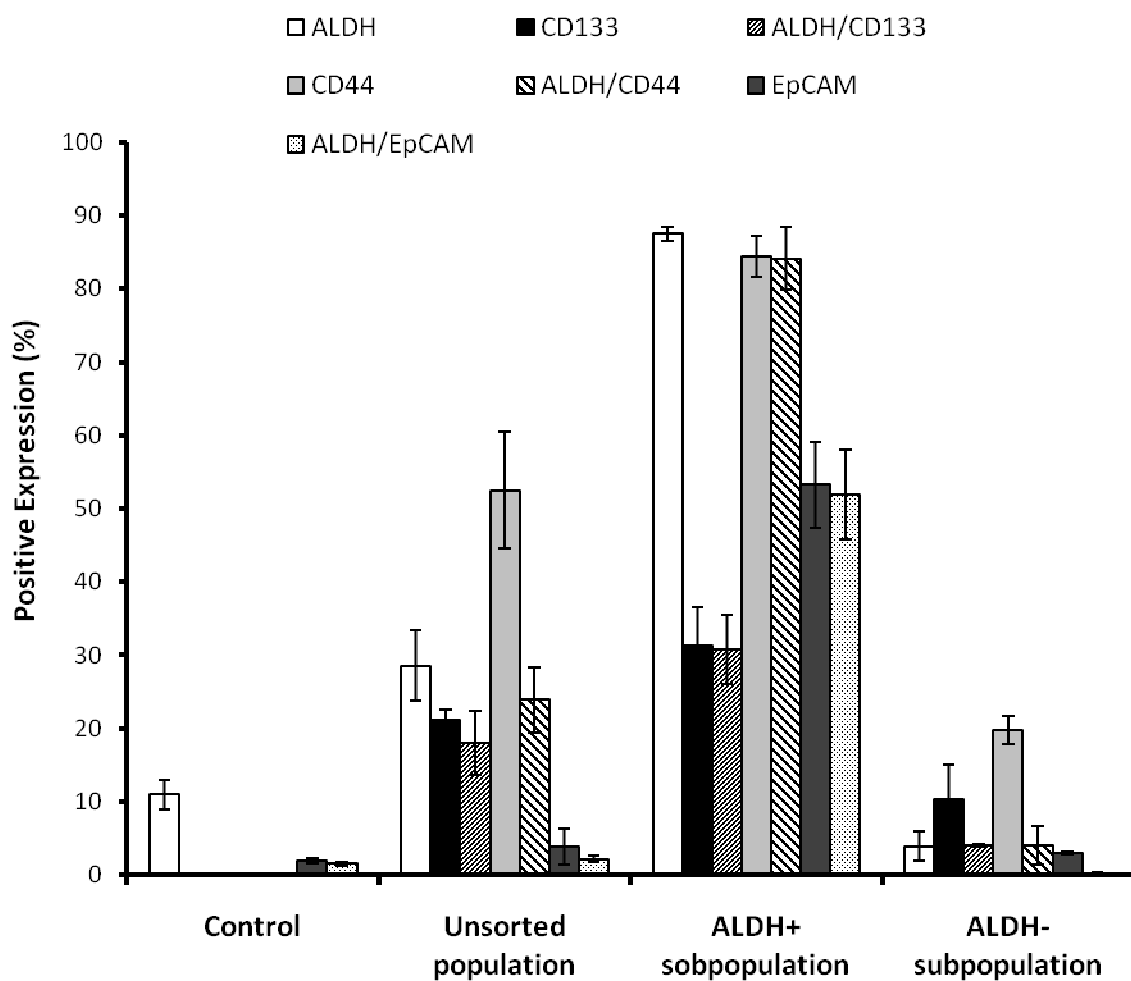


Figure 50. Characterization of the unsorted and sorted populations by flow cytometry. Expression of cell surface markers CD133, CD44 and EpCAM, and ALDH activity in T-84 unsorted cells cultured in adherence in DMEM-FBS (control) and also in cells before and after their selection based on the ALDH activity cultured under colonosphere conditions for 10 days. All data were obtained from three independent experiments performed in duplicate and are expressed as mean \pm SE.

5. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CSC FROM BREAST AND COLON CANCER CELL LINES BY DIFFERENTIAL ADHESION

Recently it has been published that BCSC can be isolated by the low strength of their adherence to plastic surface through a differential trypsinization assay (Walia and Elble, 2010). Moreover, suspension cultures in specific media has been demonstrated to be more effective for maintaining SC features *in vitro* than adherent cultures (Dey et al., 2009). To determine if cancer cells with low adherence to plastic surface in culture are more tumorigenic, we developed a series of studies with a human breast cancer cell line and also with two different human colon cancer cell lines.

5.1. CELL ISOLATION FROM THE MCF-7 BREAST CANCER CELL LINE BASED ON DIFFERENTIAL ADHESION

5.1.1. CELL SURFACE MARKERS EXPRESSION

Cells obtained by differential trypsinization and cultured in plates with Ultra-Low Attachment surface in Spheres Medium were assessed for the expression of different cell surface markers associated with CCSC phenotype by flow cytometry. The content in CD44⁺/CD24^{low+} cells varied significantly ($P < 0.05$) in the cells selected by their low adherence to the culture surface in comparison with the starting population of MCF-7 cells. In the original population the percentage of the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation was $8,05 \pm 1,23\%$, while in the pool of cells trypsin-sensitive selected after one cycle of differential trypsinization (1st Trypsinization) this percentage increased to $57,4 \pm 7,86\%$ (Figure 51). When cells were selected by a second cycle of differential trypsinization (2nd Trypsinization), the proportion of the subpopulation CD44⁺/CD24^{low+} in the cultures got to be $70,1 \pm 5,45\%$ (Figure 51).

This increment in the content of CD44⁺/CD24^{low+} cells observed in the trypsin-sensitive pool is indicative of a greater content in cancer cells with stem cell-like properties within this subpopulation since this phenotype was previously associated with more tumorigenic potential in breast cancer cells.

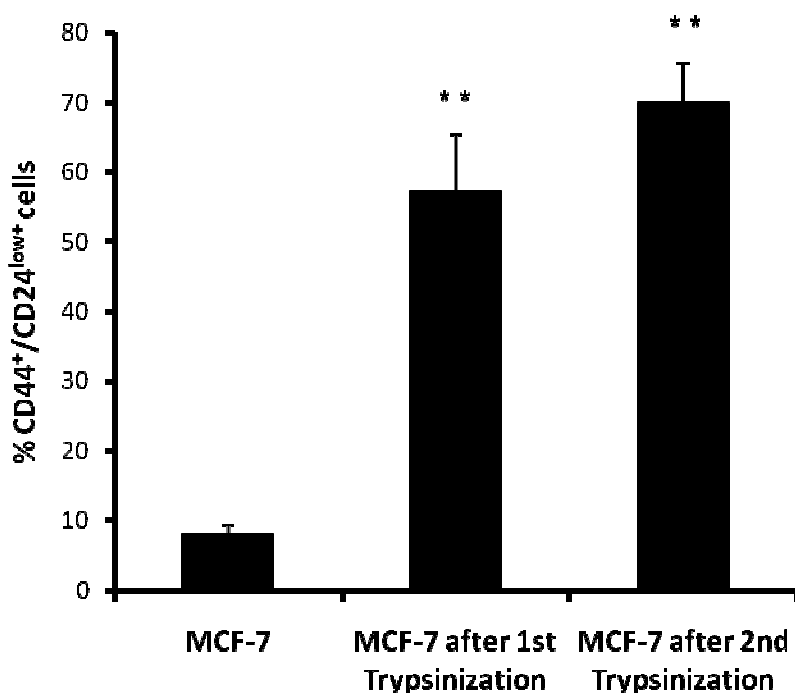


Figure 51. Proportion of CD44⁺/CD24^{low+} cells in the breast cancer cell line MCF-7 determined by flow cytometry. Co-expression of high levels of CD44 and low levels of CD24 in cells MCF-7 from the original population (considered as control), and once selected after one and two cycles of differential trypsinization. All data were obtained from three independent experiments performed in duplicate and are expressed as mean \pm SE (** P<0.05 vs the control group).

5.1.2. STUDY OF THE SIDE POPULATION FRACTION

A property of CSC is their ability to efflux the fluorescent dye Hoechst 33342 which is related with an over-expression of MDR proteins that are involved in chemoresistance. SP fraction was determined in the cell subpopulation obtained after 2nd Trypsinization and cultured in plates with Ultra-Low Attachment surface in Spheres Medium and compared with the SP fraction existent in the original population of MCF-7 cultured in adherence in DMEM-FBS medium. MCF-7 cells incubated with Hoechst 33342 and Verapamil, an inhibitor of MDR pumps, were used as internal control for this assay. The subpopulation isolated by differential trypsinization showed higher SP fraction in respect to the starting population of MCF-7 cells ($23,4 \pm 4\%$ and $4,9 \pm 0,88\%$ respectively, P<0.05) as it is shown in Figure 52.

The trypsin-sensitive population of the cell line MCF-7 is enriched in cells with high capability to efflux the fluorescent dye Hoechst 33342. Hence, these cells over-express MDR proteins that are associated to the CSC phenotype.

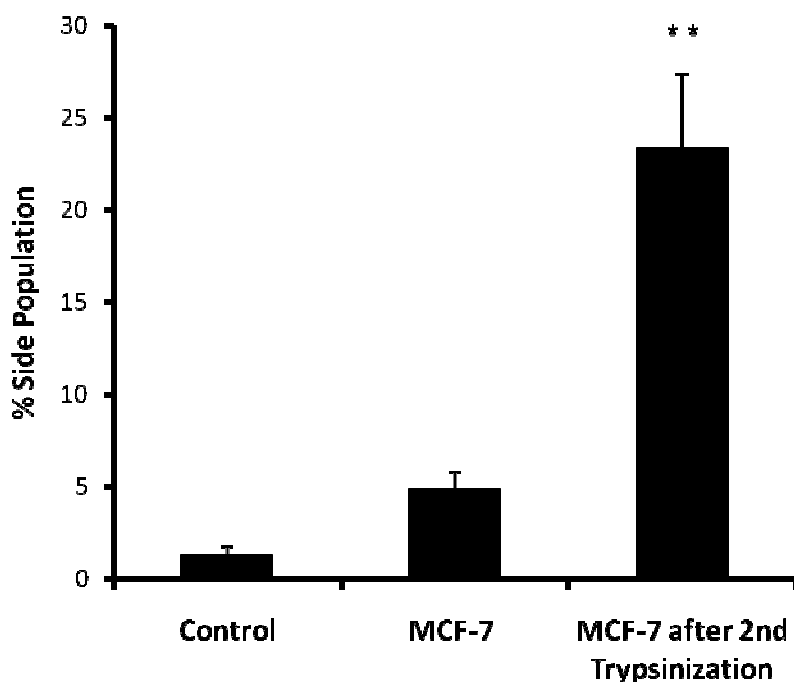


Figure 52. Proportion of cells with the ability to efflux the fluorescent dye Hoechst 33342 assessed by flow cytometry in the breast cancer cell line MCF-7. Percentage of the SP fraction in the cell line MCF-7 and in the subpopulation trypsin-sensitive isolated after two cycles of differential trypsinization and cultured as mammospheres. MCF-7 cells incubated with Hoechst 33342 and Verapamil were used as negative control for the experiment. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE (** $P < 0.05$ vs MCF-7).

5.1.3. LIMITING DILUTION ASSAY

Functionally, CSC are characterized by their ability to generate mammospheres in floating cultures. MCF-7 cells from the original population and trypsin-sensitive cells isolated by two cycles of differential trypsinization were cultured in 6 well plates with Ultra-Low Attachment surface in Spheres Medium. Spheres formed were dissociated and subsequently cultured at a single cell density in a limiting dilution assay (Figure 53). The trypsin-sensitive subpopulation contained 10-fold higher cells-initiating

mammosphere than the starting population. Furthermore, mammospheres formed by trypsin-sensitive cells were larger than these generated by MCF-7 cells before selection (data not shown).

The greater mammosphere-forming ability of the trypsin-sensitive pool and their higher self-renewal capacity, demonstrated by limiting dilution assays, suggest that this subpopulation is enriched in CSC, as was predicted based on their phenotypic characterization and their higher SP fraction.

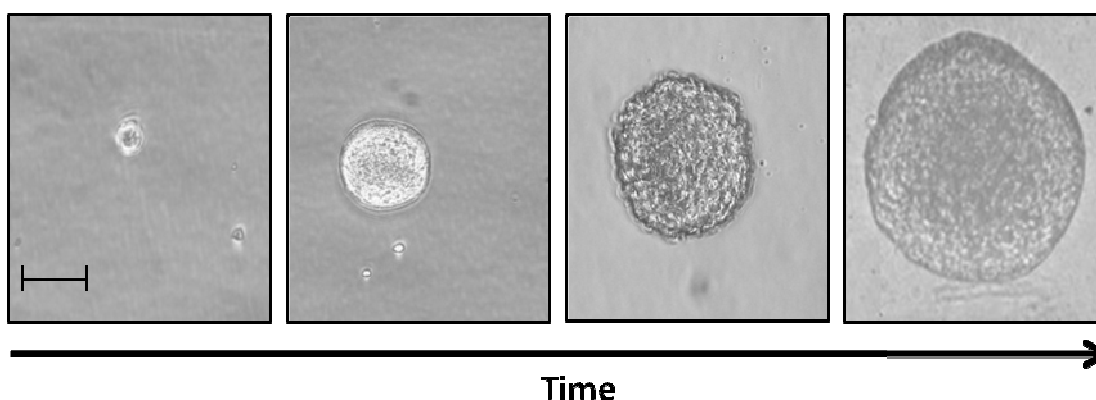


Figure 53. Mammosphere formation from a single cell. Contrast phase microscopy of a mammosphere generated from a trypsin-sensitive cell seeded at a single cell density in a limiting dilution assay. Scale bar = 100 μm .

5.2. CELL ISOLATION FROM THE T-84 COLON CANCER CELL LINE BASED ON DIFFERENTIAL ADHESION

5.2.1. ALDH ACTIVITY

Cells obtained by differential trypsinization and cultured in plates with Ultra-Low Attachment surface in Spheres Medium were assessed for the ALDH activity by flow cytometry. Cells trypsin-sensitive selected after two cycles of differential trypsinization were significantly ($P < 0.05$) enriched in cells ALDH⁺ as it is shown in Figure 54. While the percentage of cells ALDH⁺ in the total population was around 10%, in cells trypsin-sensitive this percentage reached to be >40% (Figure 54). These results demonstrate

an enrichment in ALDH⁺ cells within the trypsin-sensitive population, being this property characteristic of CSC.

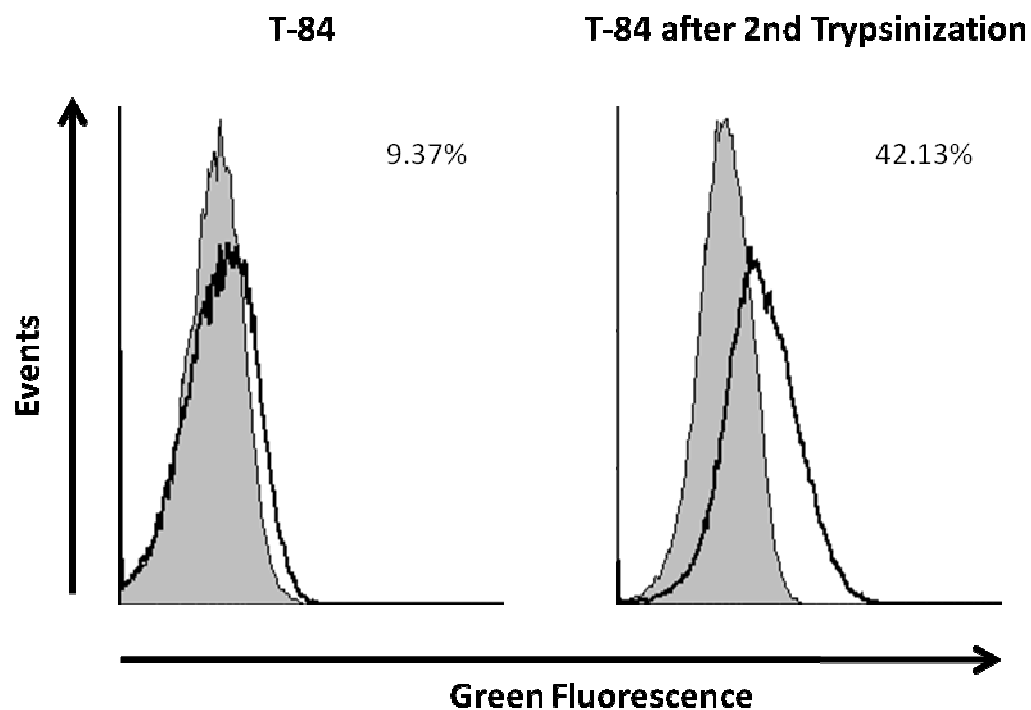


Figure 54. Determination of ALDH activity by flow cytometry using Aldefluor™ kit. Percentage of cells ALDH⁺ in the T-84 unsorted cells cultured in DMEM-FBS (left) and in cells isolated after two cycles of differential trypsinization cultured in Spheres Medium (right). Grey histograms identify the fluorescence in the DEAB tube (negative).

5.2.2. TUMORIGENIC POTENTIAL OF TRYPSIN-SENSITIVE T-84 CELLS

An assay of tumorigenicity in nude mice was performed in order to determine the CSC properties of the cells isolated for their low adherence to the culture surface after two cycles of differential trypsinization (2nd Trypsinization) and subsequently cultured as colonospheres. A total of 10⁴ cells per mouse were injected subcutaneously into NOD/SCID mice to determine their tumorigenic potential compared with the original population. Two weeks after injection all mice transplanted with 10⁴ cells obtained after 2nd Trypsinization developed tumours, while equal numbers of T-84 cells from the original population did not (Table 13). After 8 weeks, tumours grew only in 3 of 4 mice inoculated with 10⁴ T-84 cells from the cell line (Table 13). Furthermore,

tumours size was smaller in these mice in comparison with tumours generated from cells selected by two cycles of differential trypsinization (data not shown).

Data obtained demonstrate that trypsin-sensitive T-84 cells generate xenograft tumours with shorter latency than the original population, and therefore that this subpopulation has a greater tumorigenic potential than trypsin-resistant cells.

Table 13. Tumour formation ability of T-84 cells and trypsin-sensitive cells isolated after two cycles of differential trypsinization.

TUMOURS / MICE INJECTED	2 weeks after injection	8 weeks after injection
Injection of 10⁴ T-84 cells from the original population	0 / 4	3 / 4
Injection of 10⁴ T-84 cells obtained after 2nd Trypsinization	4 / 4	4 / 4

5.2.3. REESTABLISHMENT OF TUMOUR HETEROGENEITY

Tumours from nude mice were dissociated and assessed for the ALDH activity by flow cytometry. The proportion of cells ALDH⁺ in the tumours generated from cells isolated for their low adherence to the culture surface after two cycles of differential trypsinization was similar to the percentage of ALDH⁺ cells found in the original cell line T-84 before selection of trypsin-sensitive cells (Figure 55).

Present data not only determine a greater tumorigenic potential of the trypsin-sensitive subpopulation, but also that these cells have the ability to form tumours that recapitulate the original population, at least with regard to the ALDH activity, having been previously observed a relationship between a high ALDH activity and the expression of markers associated to CCSC such as CD133 and EpCAM.

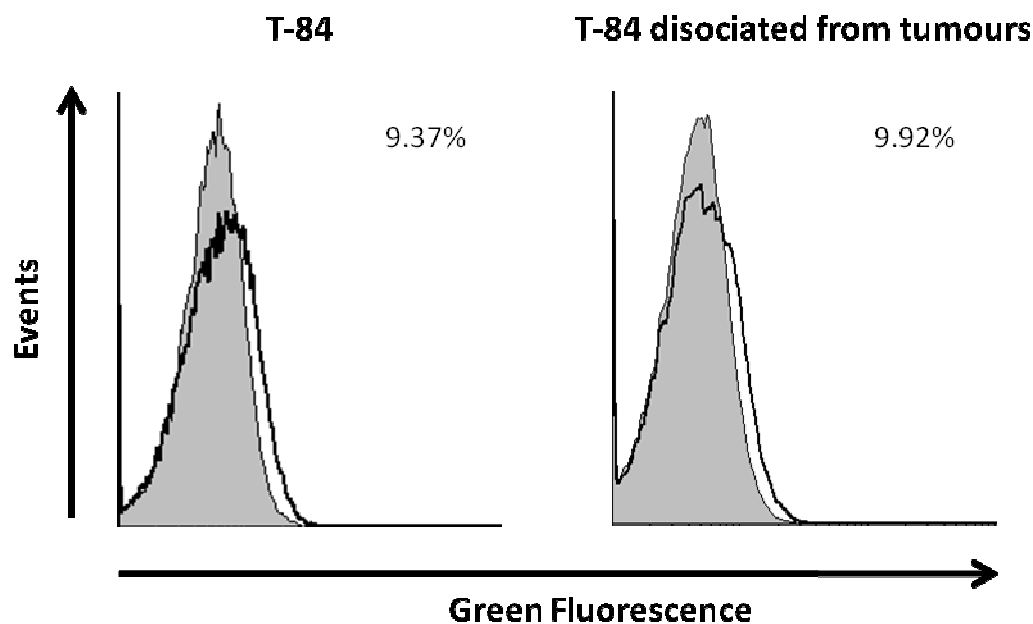


Figure 55. Determination of ALDH activity by flow cytometry using the Aldefluor™ kit. Percentage of cells ALDH⁺ in the T-84 unsorted cells cultured in DMEM-FBS (left) and in cells dissociated from tumours formed in mice after injection of T-84 2nd Trypsinization cells (right). Grey histograms identify the fluorescence in the DEAB tube (negative).

5.3. CELL ISOLATION FROM THE HT-29 COLON CANCER CELL LINE BASED ON DIFFERENTIAL ADHESION

5.3.1. CELL SURFACE MARKERS EXPRESSION

HT-29 cells isolated by differential trypsinization and cultured in plates with Ultra-Low Attachment surface in Spheres Medium were assessed for the expression of different cell surface markers associated with CCSC phenotype by flow cytometry. CD133, CD44 and EpCAM were highly expressed in HT-29 cells (Figure 56), although trypsin-sensitive cells isolated after one cycle of differential trypsinization (1st Trypsinization) showed higher expression of these cell surface antigens (Figure 56). After two cycles of trypsinization (2nd Trypsinization) cells maintained this high expression, that was near to 100%, for all the markers tested, which are associated with a CCSC phenotype (Figure 56).

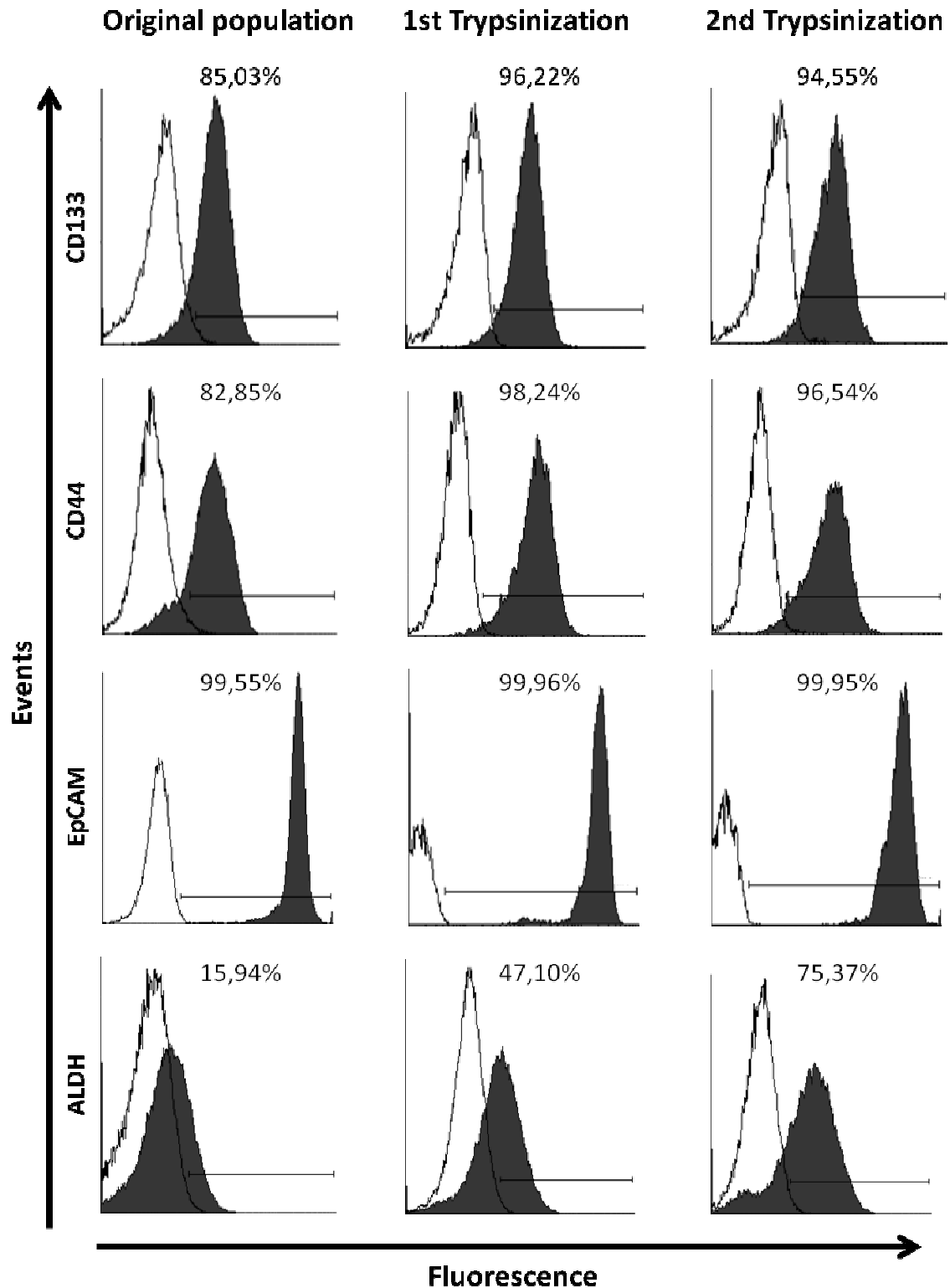


Figure 56. Characterization of HT-29 cells for the expression of different CCSC markers and the ALDH activity by flow cytometry. Expression of CD133, CD44 and EpCAM markers, and ALDH activity in HT-29 cells before and after selection by differential trypsinization. White histograms identify the negative controls (isotype controls for markers and DEAB tube for ALDH).

5.3.2. ALDH ACTIVITY

When ALDH activity was assessed in HT-29 cells before and after selection of trypsin-sensitive cells by differential trypsinization the percentage of cells ALDH⁺ varied very markedly. ALDH activity was much more elevated in trypsin-sensitive cells than in the unsorted population ($P < 0.05$). While HT-29 cells showed a percentage of ALDH cells close to 15%, this percentage in cells selected after one cycle of differential trypsinization was >45%, and >75% after the 2nd Trypsinization (Figure 56).

The enhanced expression of certain cell surface antigens, such as CD133 and CD44, and the higher ALDH activity in the trypsin-sensitive pool are indicative that this subpopulation of the colon cancer cell line HT-29 is enriched in cancer cells with stem cell-like properties.

6. ROLE OF CYTOKINES IN THE ENRICHMENT OF CSC IN BREAST CANCER

6.1. TREATMENT WITH PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES

6.1.1. VARIATIONS IN THE PROPORTION OF CD44⁺/CD24^{low+} CELLS

In order to determine the effect of pro-inflammatory cytokines in CD44 and CD24 cell surface markers expression, MDA-MB-231 cells were cultured for 7 days in DMEM-FBS medium supplemented with 10 ng/mL of CCL2, CCL5, IP-10, IL-6 or 100 ng/mL of IL-8. Control MDA-MB-231 cells were grown in cytokines free medium.

All the cytokines tested produced a significant variation ($P < 0.05$) in the proportion of CD44⁺/CD24^{low+} cells in the cultures after 7 days (Figure 57). The percentage of the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation was higher in all cell cultures exposed to cytokines for 7 days respect to MDA-MB-231 cells cultured in cytokines free medium considered as control (Figure 57). Major differences were observed in cells treated with CCL2, IL-6 and IL-8 as it is shown in Figure 57.

These results show that cytokines produce a significant increase in the total number of CD44⁺/CD24^{low+} cells within the population, which have been associated previously with a major tumorigenic potential than CD44⁺/CD24^{neg} cells.

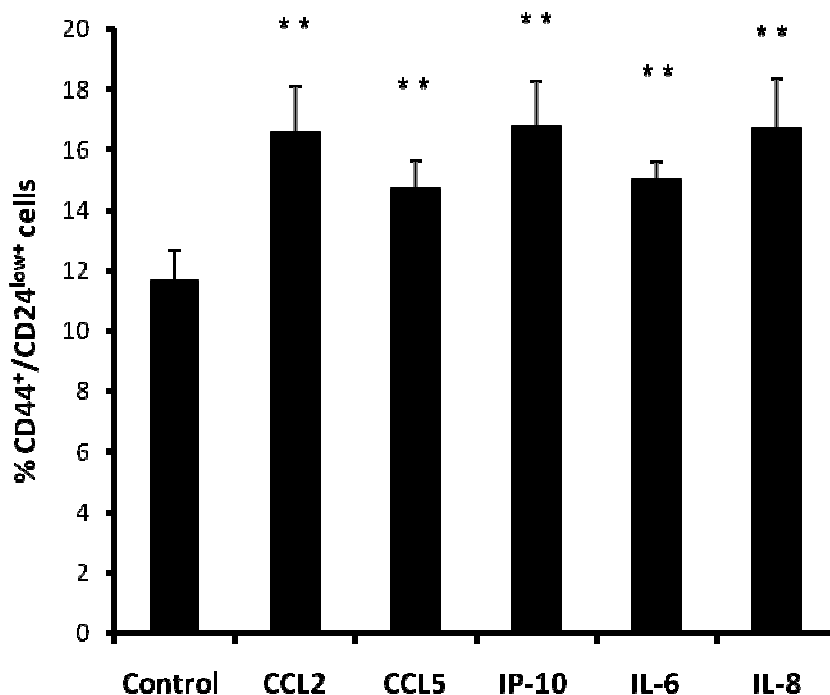


Figure 57. Proportion of CD44⁺/CD24^{low+} cells in the cultures after 7 days. Percentage of the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation in cultures exposed to different cytokines for 7 days and in untreated MDA-MB-231 cells (control). All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE (** P<0.05 vs control group).

6.1.2. EFFECT OF CYTOKINES IN PROLIFERATION AND THE CELL CYCLE

Cells treated for 7 days with the specified cytokines were compared with MDA-MB-231 cells cultured for the same period in cytokines free DMEM-FBS medium to determine the effect of these cytokines in cellular division. MDA-MB-231 cells showed a high proliferation rate, growing exponentially and doubling the population more than 5 times after 7 days in culture in all cases, but not significant differences were observed between controls and cytokines-exposed cells (Figure 58).

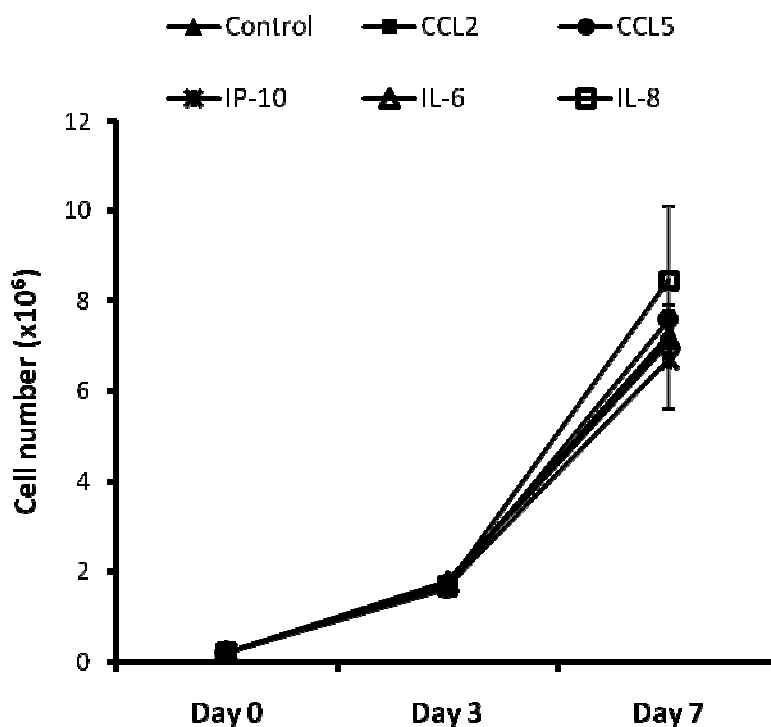


Figure 58. Cell proliferation curves observed in each culture. Estimation of the cell number evolution in cultures of MDA-MB-231 cells treated for 7 days with different cytokines. Cells cultured in cytokines free medium for the same period were considered as control. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE.

Cell cycle distribution was studied in cells treated for 7 days with the cytokines using cells no exposed as control. The percentage of cells in each cell cycle phase was estimated by flow cytometry after BrdU/PI labeling. The cell distribution in the different cell cycle phases was similar in the untreated cells and in cells cultured for 7 days in presence of cytokines (Figure 59). Cell populations were actively cycling in all cases as is showed by the high proportion of cells in S and G2/M phases in the cultures, >40% and >12% respectively (Figure 59).

The percentage of cells in the different cell cycle phases in CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} subpopulations present in the cultures was determined by flow cytometry using Hoechst 33342 labeling in combination with CD44 and CD24 staining. No significant differences were observed between cells exposed to all the cytokines assessed and untreated cells when were compared each subpopulation independently (Figure 60). However, in all cultures the proportion of cells in S and G2/M phases was

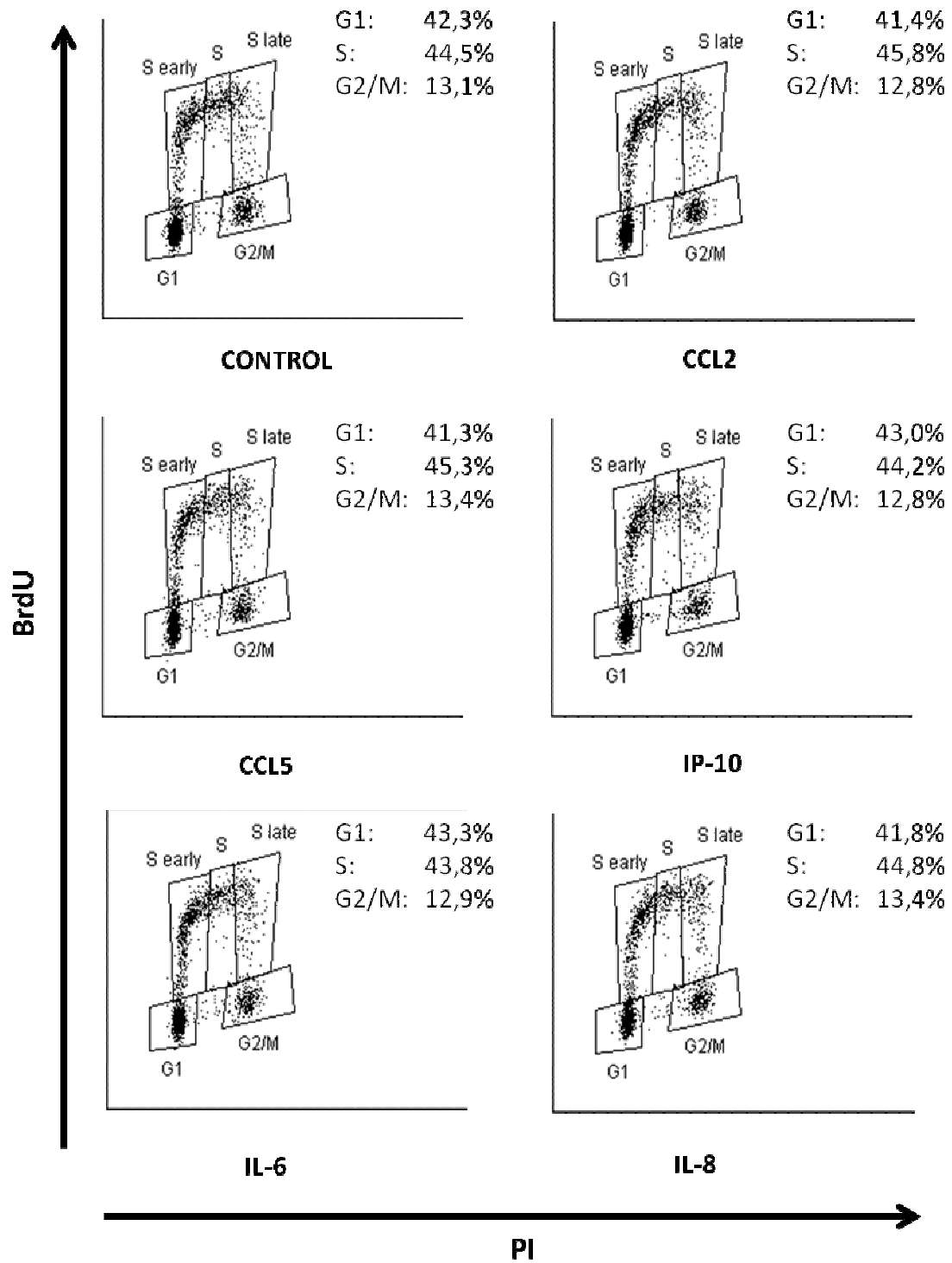


Figure 59. Cell cycle analysis in cells cultured for 7 days with and without cytokines. Cells distribution through the different cell cycle phases estimated by flow cytometry using BrdU/PI staining in cells exposed for 7 days to diverse cytokines and in untreated cells (control).

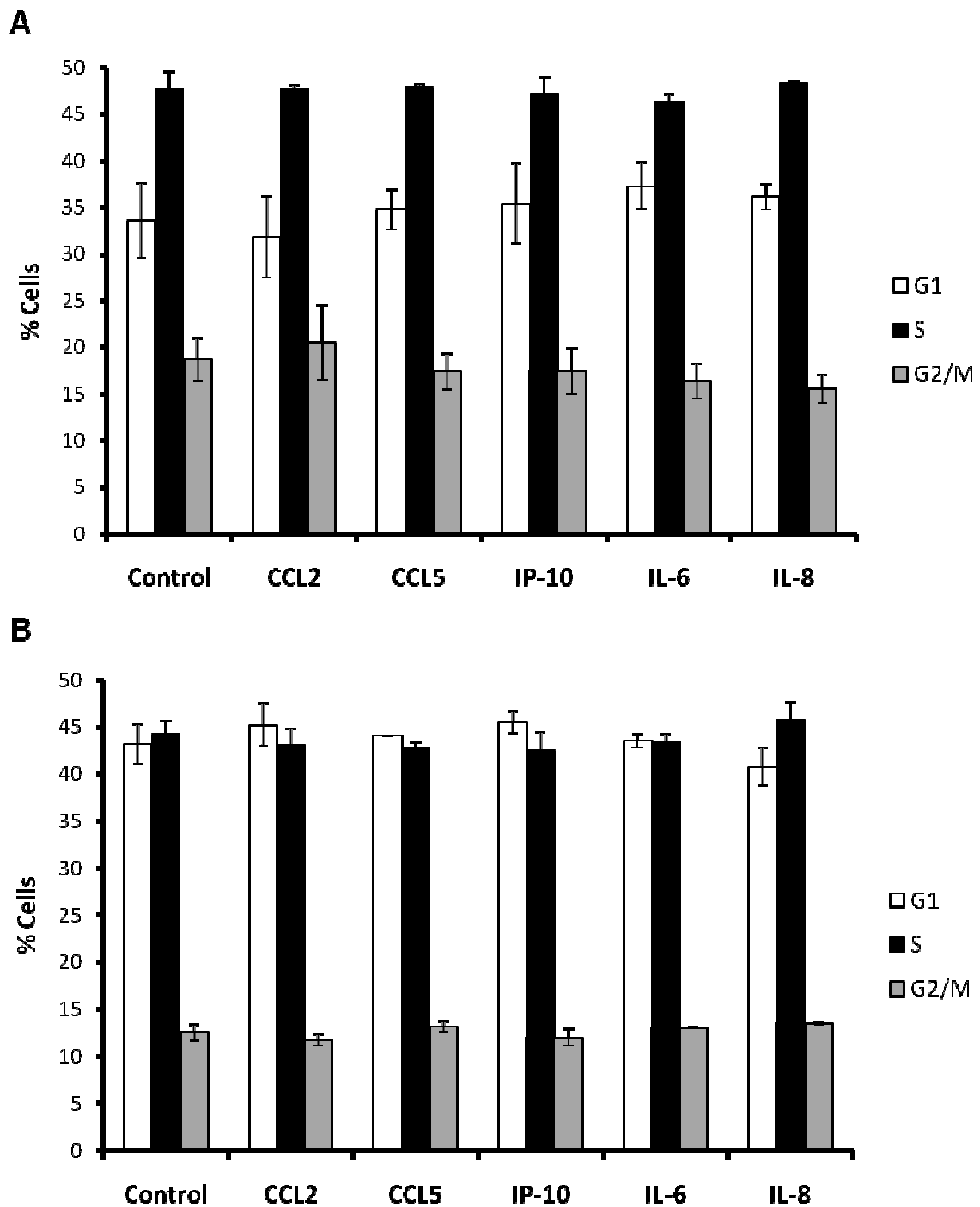


Figure 60. Cell cycle analysis in CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} cells. (A) Cell cycle profile of CD44⁺/CD24^{low+} and (B) CD44⁺/CD24^{neg} subpopulations present in cell cultures maintained for 7 days in presence of different cytokines. Control group represent MDA-MB-231 cells cultured in free cytokines DMEM-FBS medium for 7 days. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE.

significantly higher ($P < 0.05$) for CD44⁺/CD24^{low+} than CD44⁺/CD24^{neg} cells, with an approximate mean difference of 5% and 4% respectively, as it can be observed in Figure 60.

Therefore, present data show that CCL2, CCL5, IP-10, IL-6 or IL-8 do not have any effect in the cell cycle profile, neither considering the total population nor when CD44⁺/CD24^{low+} and CD44⁺/CD24^{neg} subpopulations were studied separately, at least under the experimental conditions used. Moreover, CD44⁺/CD24^{low+} cells possess a greater proliferative capacity than CD44⁺/CD24^{neg} cells under standard culture conditions. All together, these results show that cytokines have an effect in the cell fate, since they do not affect the cell cycle profile but produce a significant increase in the proportion of CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation within the cultures.

6.1.3. ALDH ACTIVITY IN MDA-MB-231 CELLS EXPOSED TO CYTOKINES

ALDH expression in MDA-MB-231 cells was analyzed by flow cytometry using the Aldefluor™ kit. This tumour cell line showed a very low ALDH activity, $0,6 \pm 0,1\%$, when cultured in DMEM-FBS medium (control) (Figure 61). However, MDA-MB-231 cells cultured for 7 days in DMEM-FBS medium containing CCL-2, IL-6 or IL-8 cytokines, showed a significant increase in the percentage of ALDH⁺ cells (Figure 61). In particular, CCL-2 exposure increased ALDH activity >2-fold when compared with the control group (Figure 61). No significant differences in ALDH activity were observed between MDA-MB-231 cells cultured in cytokines free medium and cells treated for 7 days with CCL-5 or IP-10 (Figure 61).

6.1.4. EFFECT OF CYTOKINES IN NOTCH PATHWAY ACTIVATION AND c-MYC AND SOX2 EXPRESSION

CSC are characterized by a deregulation of diverse signaling pathways involved in self-renewal and differentiation, such as the Notch pathway, and the over-expression of certain transcription factors related with pluripotency, such as SOX2 and c-MYC. Notch activation is mediated by the proteolytic cleavage of the NOTCH receptor and the liberation of the activated NICD to cytoplasm (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011). In order to test the effect of cytokines in the Notch activation and in the

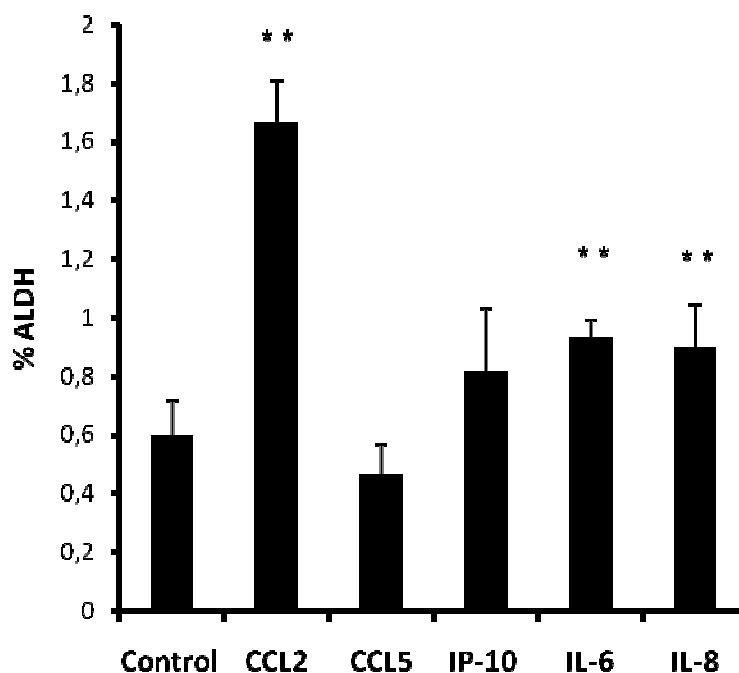


Figure 61. Determination of ALDH activity by flow cytometry using the Aldefluor™ kit. Percentage of cells ALDH⁺ in MDA-MB-231 cells cultured in DMEM-FBS (control) and also in cells exposed to CCL2, CCL5, IP-10, IL-6 or IL-8 for 7 days. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE (** P<0.05 vs control group).

expression of transcription factors associated to CSC, a Western-Blot assay was developed to determine cleaved NOTCH1, c-MYC and SOX2 levels in MDA-MB-231 cells. Cells exposed for 12 hrs to all the cytokines showed an increase in the cleaved NOTCH1 levels in comparison with untreated cells, as it is shown in Figure 62. c-MYC expression was notably much higher in cells cultured with all the cytokines assessed than in cells cultured in cytokines free DMEM-FBS medium used as control (Figure 62). In regard to SOX2, its expression was a little higher in cells cultured with CCL2, CCL5 or IL-8 but this increase was not appreciable in the other culture conditions (Figure 62).

The major expression of transcription factors related with pluripotency, mainly c-MYC, and the Notch activation determined in this study are in concordance with the previous results that indicated enrichment in cancer cells with stem cell-like properties in cultures exposed to cytokines.

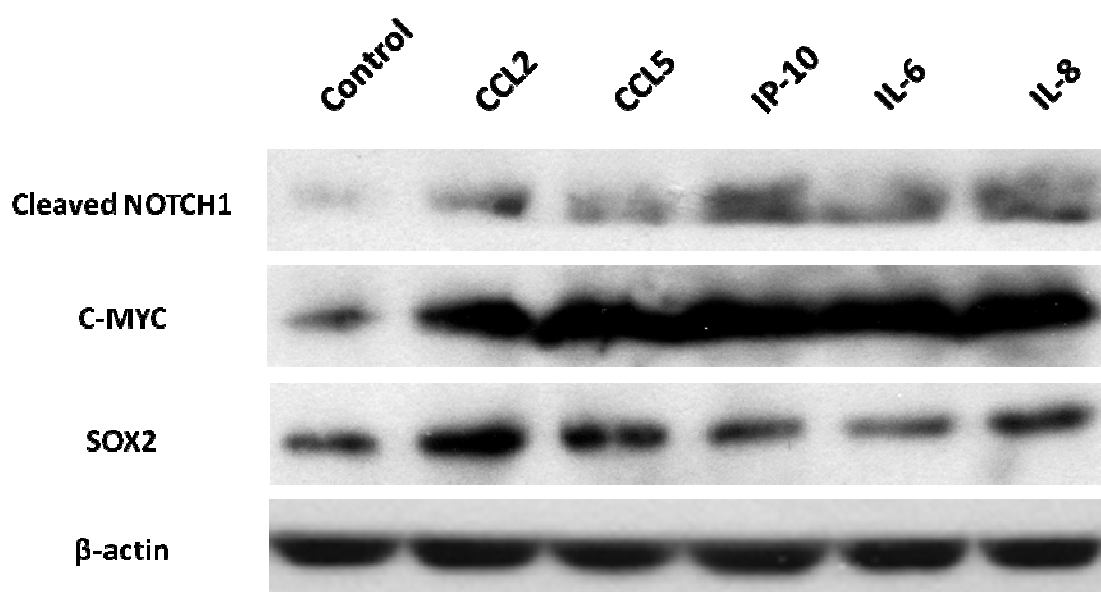


Figure 62. Western-Blot analysis for the expression of different proteins related with CSC phenotype in cells cultured with and without cytokines. Expression levels of cleaved NOTCH1, c-MYC and SOX2 in cells exposed to different cytokines for 12 hours and in MDA-MB-231 cells untreated (control). As housekeeping protein was used β -actin.

6.1.5. MAMMOSPHERE AND COLONY-FORMATION ASSAYS ON MDA-MB-231 CELLS EXPOSED TO CYTOKINES

The effect of CCL2, CCL5, IP-10, IL-6 and IL-8 in the mammosphere and colony-forming ability, two hallmarks of CSC, was tested in the breast cancer cell line MDA-MB-231. Cells pretreated for 7 days and subsequently cultured 1 week in floating cultures, with addition of cytokines every 2 days, showed a greater mammosphere-forming ability in comparison with cells no exposed to cytokines used as control (Figure 63A). Although the mean of mammospheres generated was higher for cytokines cultures seeding equal numbers of cells, significant differences only were found in cells that had been exposed to CCL2 or IL-8 ($P < 0.05$). In regard to the effect of cytokines in colony-forming ability, cells pretreated and subsequently cultured in soft agar for 3 weeks, maintaining the treatment, showed a significant higher capacity to form colonies than control group when were seeded equal numbers of cells for each one ($P < 0.05$) (Figure 63B). Major differences were observed in cells exposed to CCL2 and IL-8, slightly less than 3-fold and 4-fold higher cells-initiating colonies were found in these cultures than control group respectively (Figure 63B).

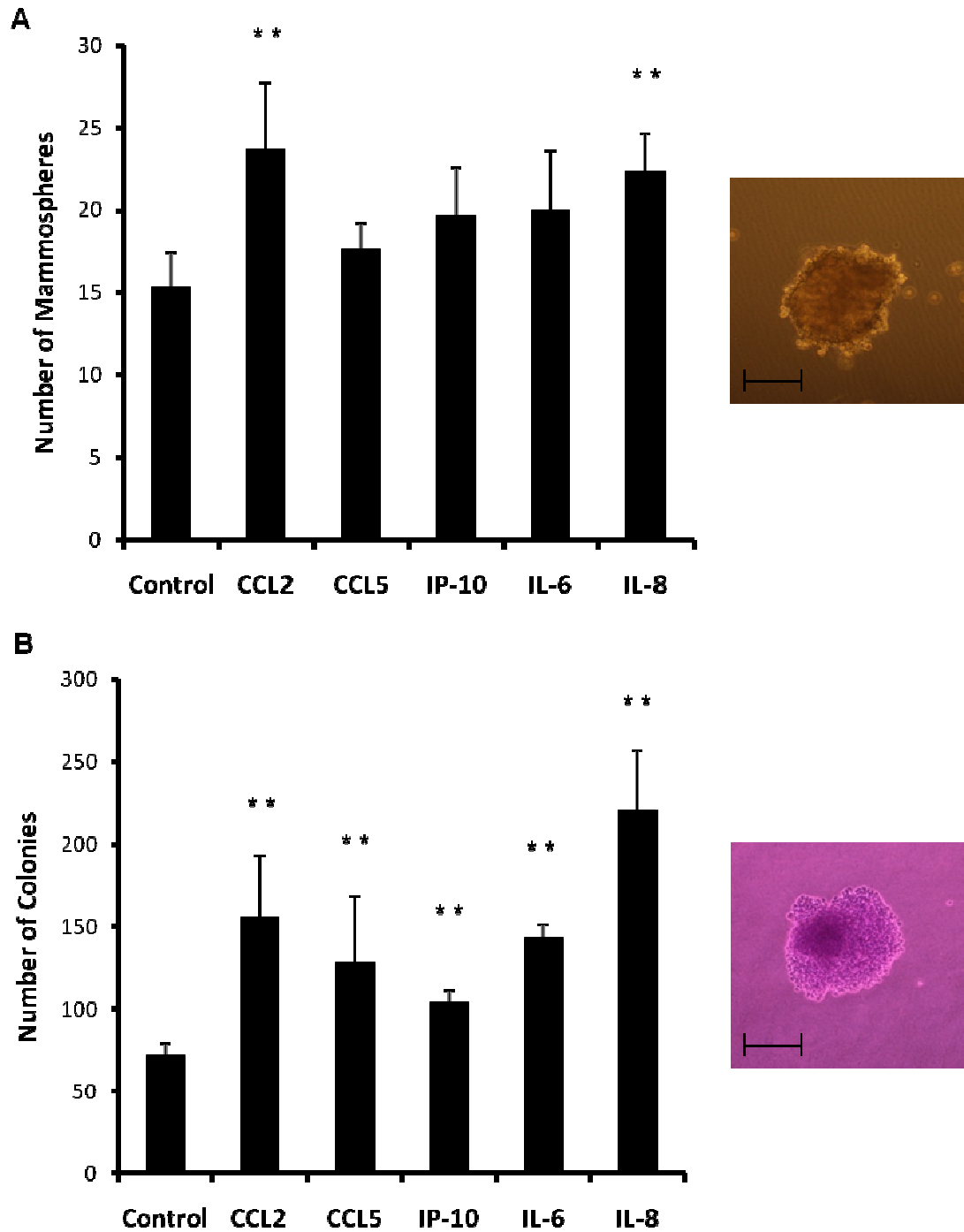


Figure 63. Mammosphere and colony-forming ability by cells cultured with and without cytokines. (A) Mammospheres formed after 7 days seeding 3×10^3 cells/well in Ultra-Low Attachment 6 well plates. (B) Colonies generated after 3 weeks in soft agar seeding 10^4 cells per 35 mm plates. Control represents MDA-MB-231 cells cultured in cytokines free medium. Data were obtained from two independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE (** $P < 0.05$ vs control group). Right pictures represent a mammosphere (upper) and a colony (bottom) formed in cultures. Scale bar = 100 μ m.

The higher ability to form mammospheres in suspension cultures and colonies in soft agar showed in MDA-MB-231 cells cultured with cytokines confirm that these produce an enrichment in CSC in the cultures, supporting a key role for these cytokines in CSC self-renewal and clonogenicity in this model.

6.2. EXPOSITION TO VEGF

6.2.1. VARIATIONS IN THE PROPORTION OF CD44⁺/CD24^{low+} CELLS

VEGF is associated with angiogenic process in tumours growth, but its role in the acquisition of stem cell-like properties is unknown. To determine the effect of VEGF in the content of CD44⁺/CD24^{low+} and CD44⁺/CD24^{neg} cells within the population, MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM-FBS medium supplemented with VEGF at a concentration of 10 ng/mL. CD44 and CD24 expression was determined by flow cytometry after 7 days and compared with MDA-MB-231 cells cultured for the same period in VEGF free DMEM-FBS medium, considered as control (Figure 64). The

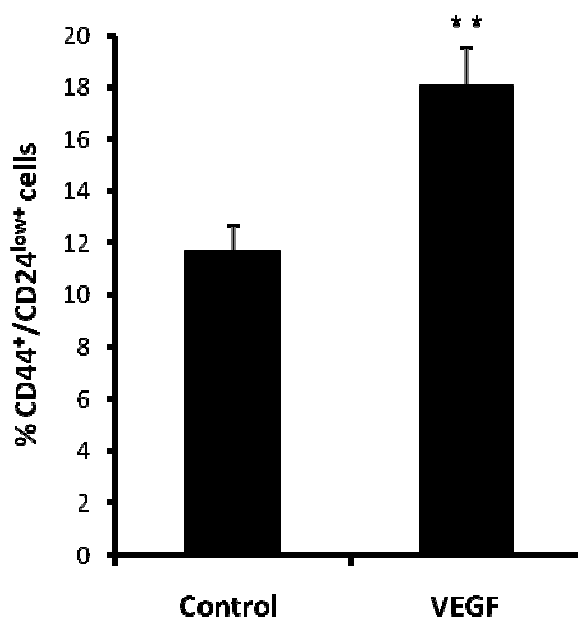


Figure 64. Proportion of CD44⁺/CD24^{low+} cells in the cultures after 7 days. Percentage of the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation in cultures exposed to VEGF for 7 days and in MDA-MB-231 cells untreated (control). All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE (** P<0.05).

percentage of CD44⁺/CD24^{low+} cells was significantly higher ($P < 0.05$) in the cultures exposed to VEGF for 7 days respect to untreated MDA-MB-231 cells, $18,07 \pm 1,1\%$ and $11,7 \pm 1\%$ respectively (Figure 64).

Therefore, VEGF exposure increase the proportion of the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation in the cultures, suggesting that VEGF may enhance the tumorigenic potential of the breast cancer cell line MDA-MB-231.

6.2.2. EFFECT OF VEGF IN PROLIFERATION AND THE CELL CYCLE

Proliferation rates were studied in MDA-MB-231 cells cultured for 7 days in DMEM-FBS medium supplemented with VEGF and also in cells cultured in DMEM-FBS medium without VEGF, considered as control. In both cultures cells grew exponentially, doubling the population more than 5 times after 7 days, and no differences were observed in the cell number generated starting with equal numbers of cells in each one (Figure 65).

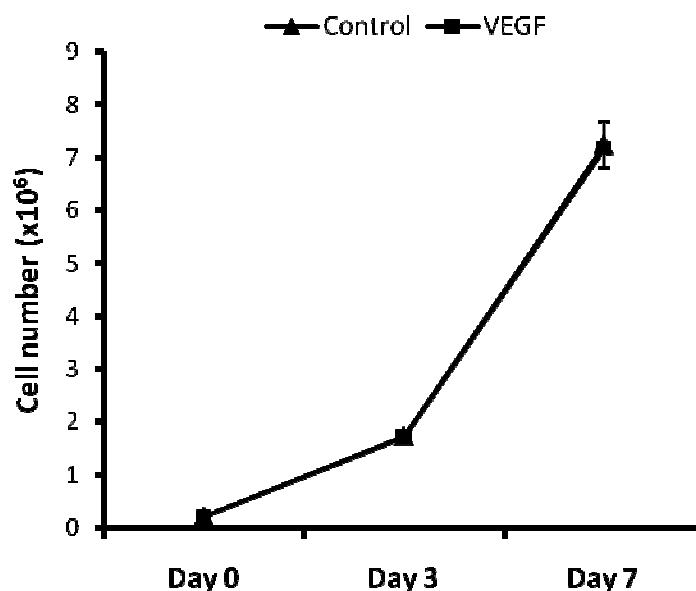


Figure 65. Cell proliferation curves observed in MDA-MB-231 cultures with and without VEGF. Estimation of the cell number evolution in cultures of MDA-MB-231 cells treated for 7 days with VEGF and also in untreated cells considered as control. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE.

In order to study the effect of VEGF in the cell cycle, MDA-MB-231 cells cultured with or without VEGF were analyzed by flow cytometry. Cell cycle profile was determined using BrdU/PI staining for the total population analysis and Hoechst 33342 labeling in combination with CD44 and CD24 conjugated antibodies for the independent study of CD44⁺/CD24^{low+} and CD44⁺/CD24^{neg} cells. Cell cycle profile was not affected by VEGF treatment, since the percentage of cells in each cell cycle phase was similar in the untreated cells and in cells cultured for 7 days in presence of VEGF both for the total population (Figure 66A), as when subpopulations CD44⁺/CD24^{low+} and CD44⁺/CD24^{neg} were analyzed separately (Figure 66B-C). Regarding to the cell cycle distribution in CD44⁺/CD24^{low+} and CD44⁺/CD24^{neg} cells, although both were actively cycling, a significant increase ($P < 0.05$) in the proportion of the S and G2/M phases was observed for the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation (Figure 66B-C).

6.2.3. ALDH ACTIVITY IN MDA-MB-231 CELLS EXPOSED TO VEGF

The effect of VEGF exposure in ALDH expression was determined by flow cytometry using the Aldefluor™ kit. MDA-MB-231 cells treated with VEGF for 7 days showed an increase ALDH activity in comparison with cells cultured in DMEM-FBS medium not supplemented with VEGF, considered as control group (Figure 67). ALDH expression estimated by the Aldefluor™ assay in MDA-MB-231 cells treated with VEGF was only $1,03 \pm 0,15\%$, however this percentage was 2-fold higher than the observed in the control group (Figure 67).

6.2.4. MAMMOSPHERE AND COLONY-FORMATION ASSAYS ON MDA-MB-231 CELLS EXPOSED TO VEGF

Self-renewal capacity and clonogenicity of cells exposed to VEGF was determined by mammosphere and colony-formation assays. MDA-MB-231 cells pretreated for 7 days with VEGF and subsequently cultured 1 week in floating cultures adding VEGF every 2 days showed a greater mammosphere-forming ability in comparison with cells no exposed to VEGF used as control ($P < 0.05$) (Figure 68A). These pretreated cells also formed a higher number of colonies in soft agar after 3 weeks when the VEGF exposure was maintained in the cultures ($P < 0.05$) (Figure 68B).

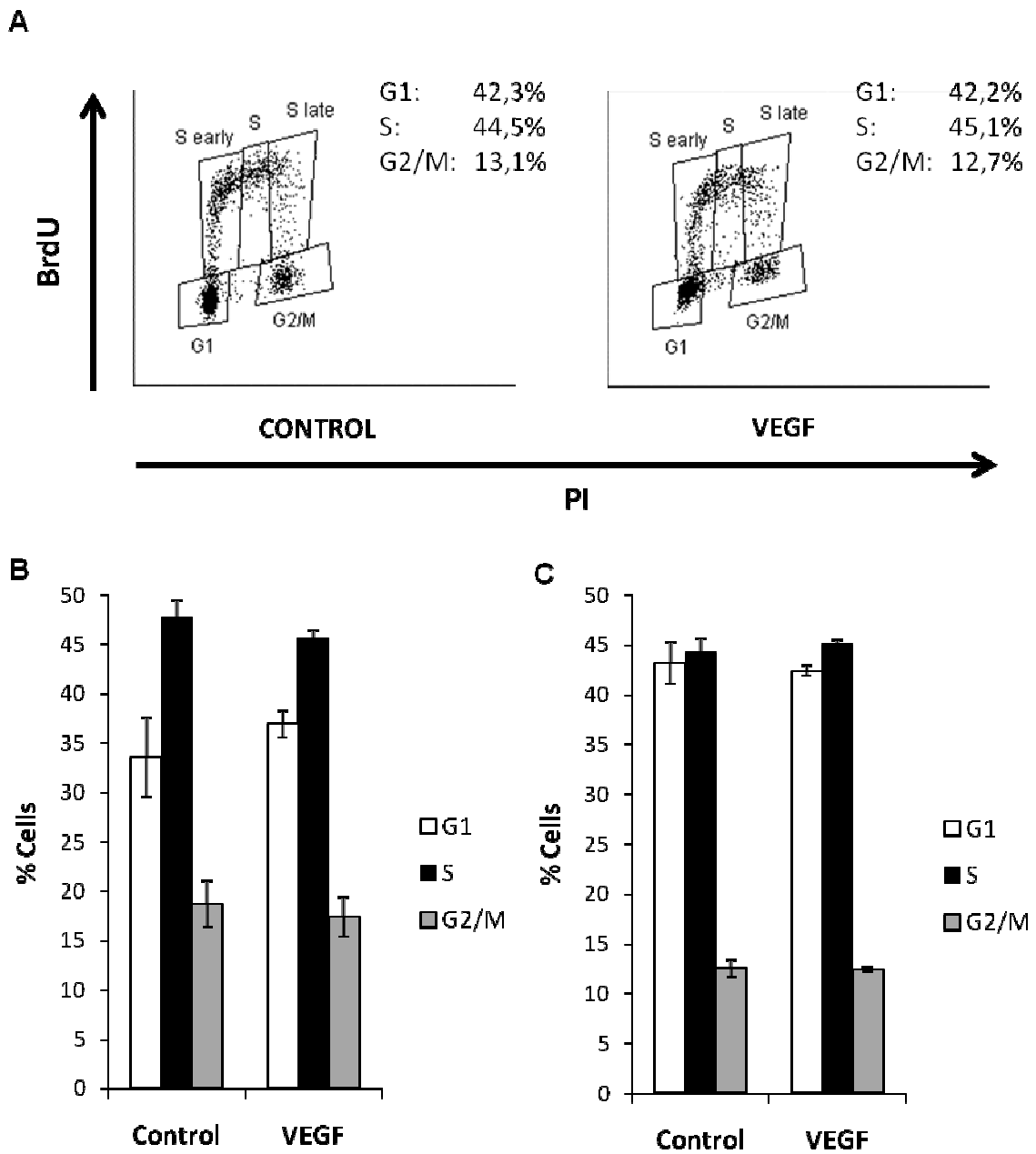


Figure 66. Cell cycle analysis in MDA-MB-231 cells cultured for 7 days with and without VEGF. (A) Cell cycle profile for the total cell population estimated by flow cytometry using BrdU/PI staining. (B) Cells distribution through the different cell cycle phases determined with Hoechst 33342 by flow cytometry in CD44⁺/CD24^{low+} and (C) CD44⁺/CD24^{neg} cells defined by the gate set for CD24 status. MDA-MB-231 cells cultured in VEGF free medium were used as control. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean ± SE.

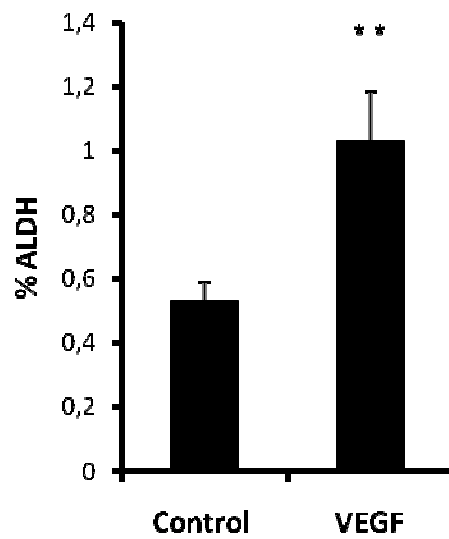


Figure 67. Determination of ALDH activity by flow cytometry using the Aldefluor™ kit. Percentage of cells ALDH⁺ in MDA-MB-231 cells cultured for 7 days in DMEM-FBS medium (control) and also in DMEM-FBS supplemented with VEGF. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE (** P<0.05).

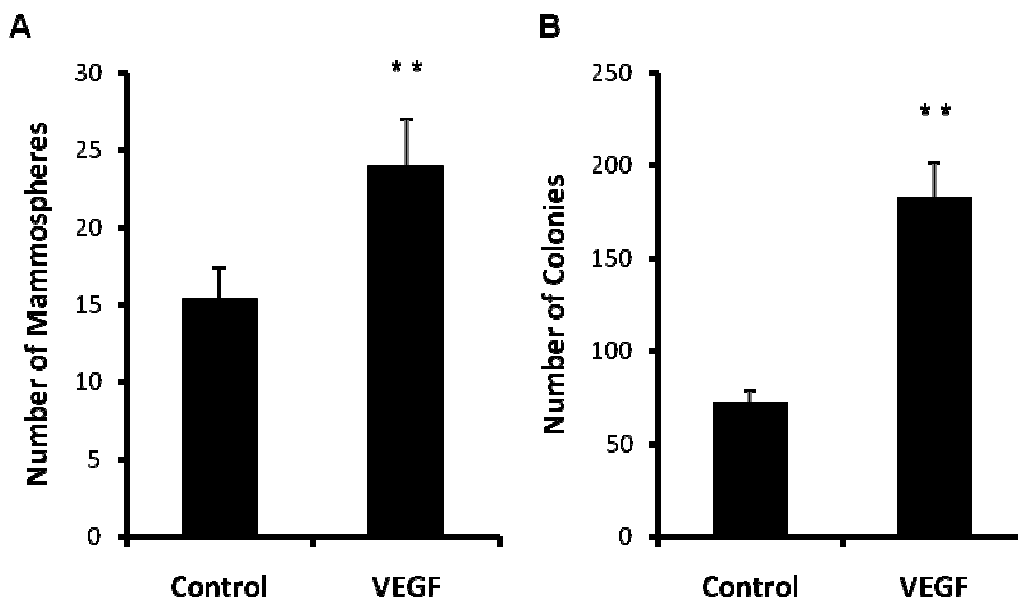


Figure 68. Mammosphere and colony-forming ability by cells cultured with and without VEGF. (A) Number of mammospheres generated in Ultra-Low Attachment 6 well plates after 7 days seeding 3×10^3 cells/well and (B) number of colonies formed in soft agar seeding 10^4 cells per 35 mm plates after 3 weeks, formed by MDA-MB-231 cells untreated (control) and treated with VEGF. All data were obtained from two independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE (** P<0.05).

Therefore, VEGF exposure directly increases mammosphere formation and clonogenic growth in soft agar without changing asynchronous cell cycle profiles in MDA-MB-231 cells, suggesting that VEGF affects to cell fate, increasing the symmetric division rate of the CD44⁺/CD24^{low+} and decreasing their asymmetric division.

6.2.5. IN VIVO TUMORIGENESIS ASSAY

The effect of VEGF to enhance tumorigenic potential on breast cancer cells was determined using L2G cells treated *ex vivo* with VEGF. Freshly dissociated L2G tumours were briefly exposed to VEGF in suspension culture for only 20 hrs and subsequently injected into NOD/SCID mice, and compared for tumorigenesis potential with untreated L2G cells (control). Bioluminescence of orthotopic tumours was determined by serial IVIS assays at 0-3-6 weeks after injection (Figure 69). L2G cells injected prior VEGF exposure generated tumours with shorter latency that grew more

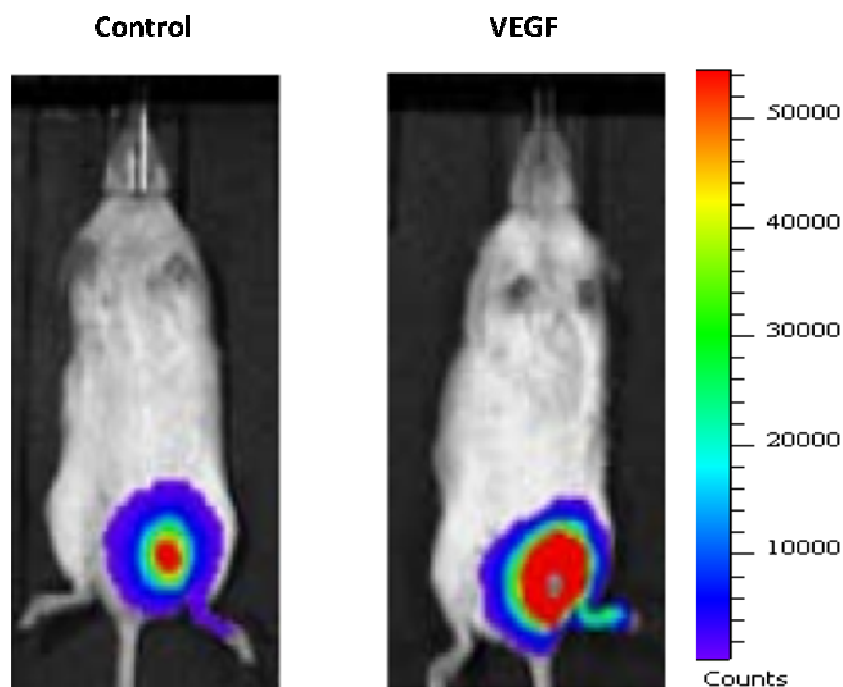


Figure 69. Effect of VEGF exposure in breast cancer tumorigenesis. Growth of orthotopic L2G tumours from 1000 cells pretreated with VEGF for 20 hours *in vitro* before mammary fat pad injection, using same amount of L2G cells cultured in VEGF free medium as control. Pictures represent tumour size after 6 weeks post-injection.

rapidly than those from untreated L2G (Figure 69). The increase in tumorigenesis cannot be attributed to direct angiogenic effects since VEGF was not added to mice during the assay, and reveal direct, sustained effects of VEGF on tumour cells. VEGF exposure increased the abundance of cancer cells with stem cell-like features since exerted long-lasting effects to promote tumorigenesis *in vivo*.

7. EFFECT OF PACLITAXEL AND γ -SECRETASE INHIBITION ON BCSC

7.1. TREATMENT OF MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS WITH PACLITAXEL

7.1.1. CELL DEATH INDUCED BY PACLITAXEL

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent widely clinically used for the treatment of different cancer types, including breast cancer, which acts stabilizing microtubules during mitosis (Yue et al., 2010). MDA-MB-231 cells were cultured for 8 days in DMEM-FBS medium containing 10 nM or 10 μ M of Paclitaxel. The number of cells seeded for this assay was very high in order to have enough cells at the final of the experiment, and live cells present in the cultures were counted at different time points. As it was expected, Paclitaxel inhibited cellular growth and induced cell death at both concentrations. Nevertheless, cell number increased from day 0 to 4 after treatment with 10 nM and decreased after day 4. On the other hand, cells cultured with 10 μ M of Paclitaxel showed a decreased in cell number over time, being more evident the effects in cell death after day 4 (Figure 70). MDA-MB-231 cells cultured in DMEM-FBS medium (control) grew exponentially as it has been shown previously (data not shown).

In order to determine the mechanism of action of Paclitaxel, cell cycle profile was analyzed at 0-24-48 hours in MDA-MB-231 cells treated with 10 μ M Paclitaxel. After 24 hours, the vast majority of cells had a tetraploid DNA content, indicating that Paclitaxel produced a detention in G2/M phase. However, some cells with a content of DNA 4n continued replicating their DNA generating cells with a 8n nuclear DNA content (Figure 71). When cells were treated for 48 hours, a decrease in cells in G1 phase, and an increase in the number of cells in G2/M phase and with a 8n DNA content was observed (Figure 71).

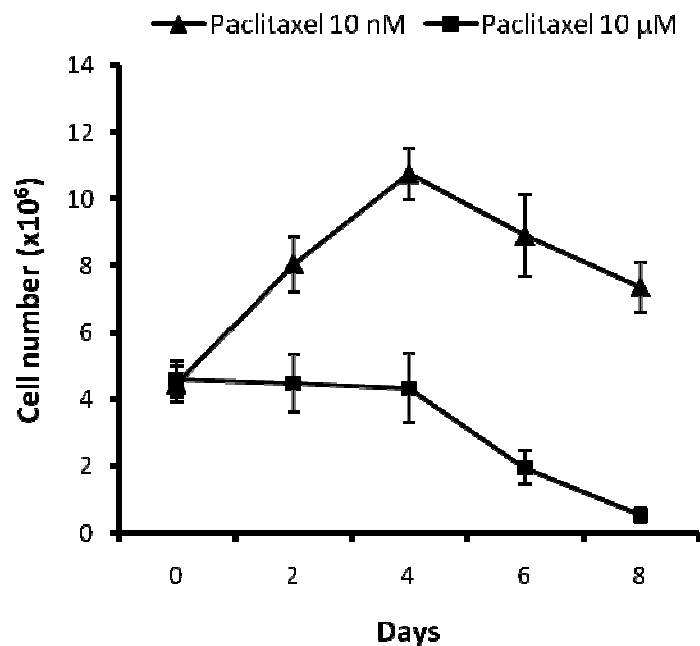


Figure 70. Cell number evolution of MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of Paclitaxel. Total number of live cells in the cultures overtime in cells treated with 10 nM or 10 μM of Paclitaxel. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean ± SE.

These results indicate that Paclitaxel produce a cellular detention in G2/M phase, although some cells continue duplicating their DNA content without dividing, resulting in the appearance of cells with a 8n nuclear DNA content. Therefore, cell death induced by Paclitaxel is due to a mitotic catastrophe produced for the microtubule stabilization that prevents cell division once cells have replicated their DNA.

7.1.2. DIFFERENTIAL RESISTANCE OF CD44⁺/CD24^{neg} AND CD44⁺/CD24^{low+} CELLS TO PACLITAXEL

In order to determine the efficacy of Paclitaxel treatment in eradicating cancer cells with stem cell-like features, we studied the effect of this drug on the proportion of CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation. Exposition to 10 nM and 10 μM of Paclitaxel for 8 days increased the percentage of CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation over time, achieving a ratio of 68,85 ± 3,2% and 83,35 ± 13,1% respectively (Figure 72). In cultures treated with 10 nM of Paclitaxel, the number of CD44⁺/CD24^{neg} began to decrease after day 4, while

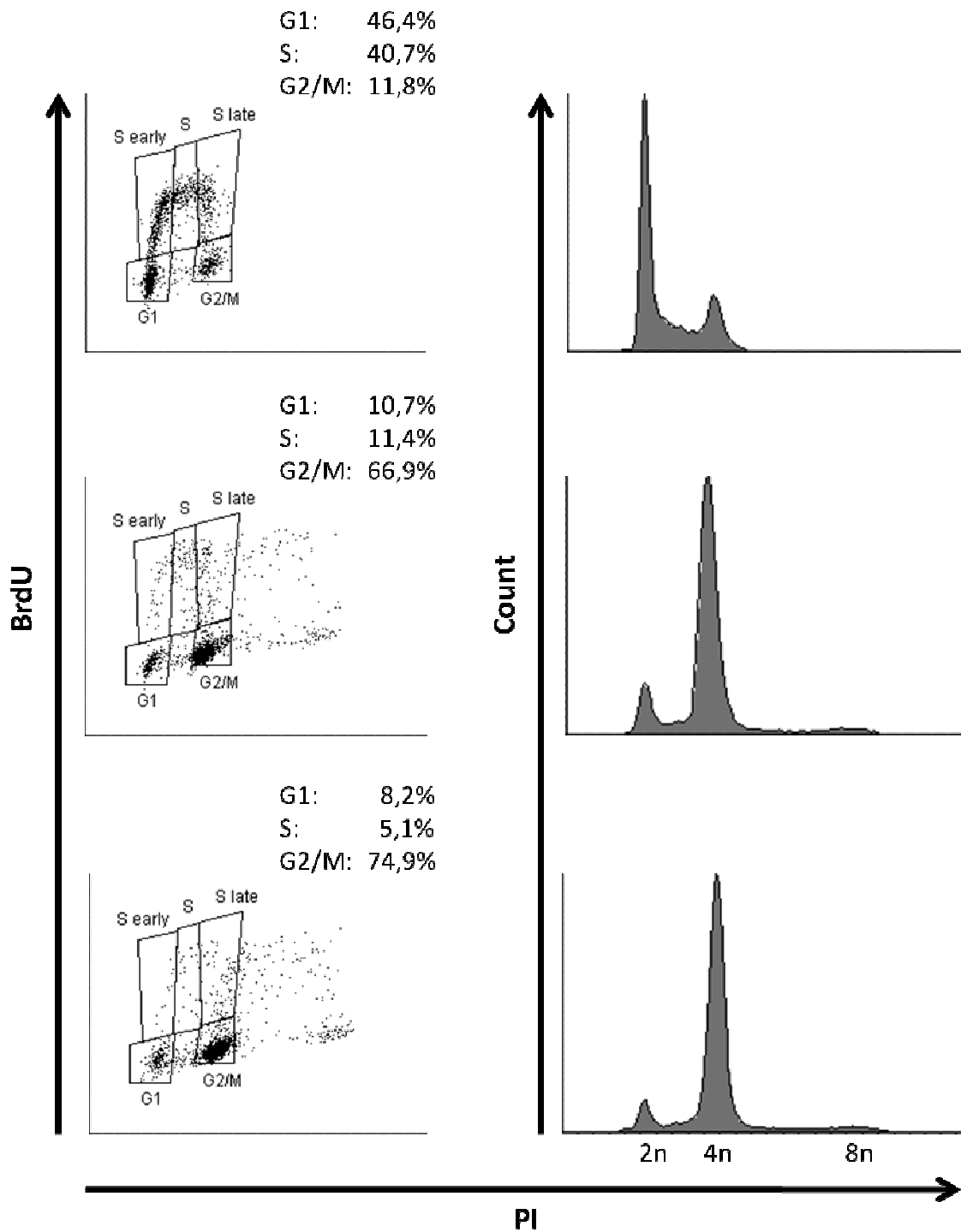


Figure 71. Cell cycle analysis in MDA-MB-231 cells treated with 10 μ M Paclitaxel. Dot plots (left) and histograms (right) obtained by flow cytometry after BrdU/PI staining, showing the effect of Paclitaxel in the cell cycle in MDA-MB-231 cells treated with 10 μ M for 48 hours. In the histograms, first peak on the left represents cells in G1 phase (2n cells), second peak corresponds to cells in G2/M phase (4n cells) and third peak symbolizes cells with a 8n nuclear DNA content.

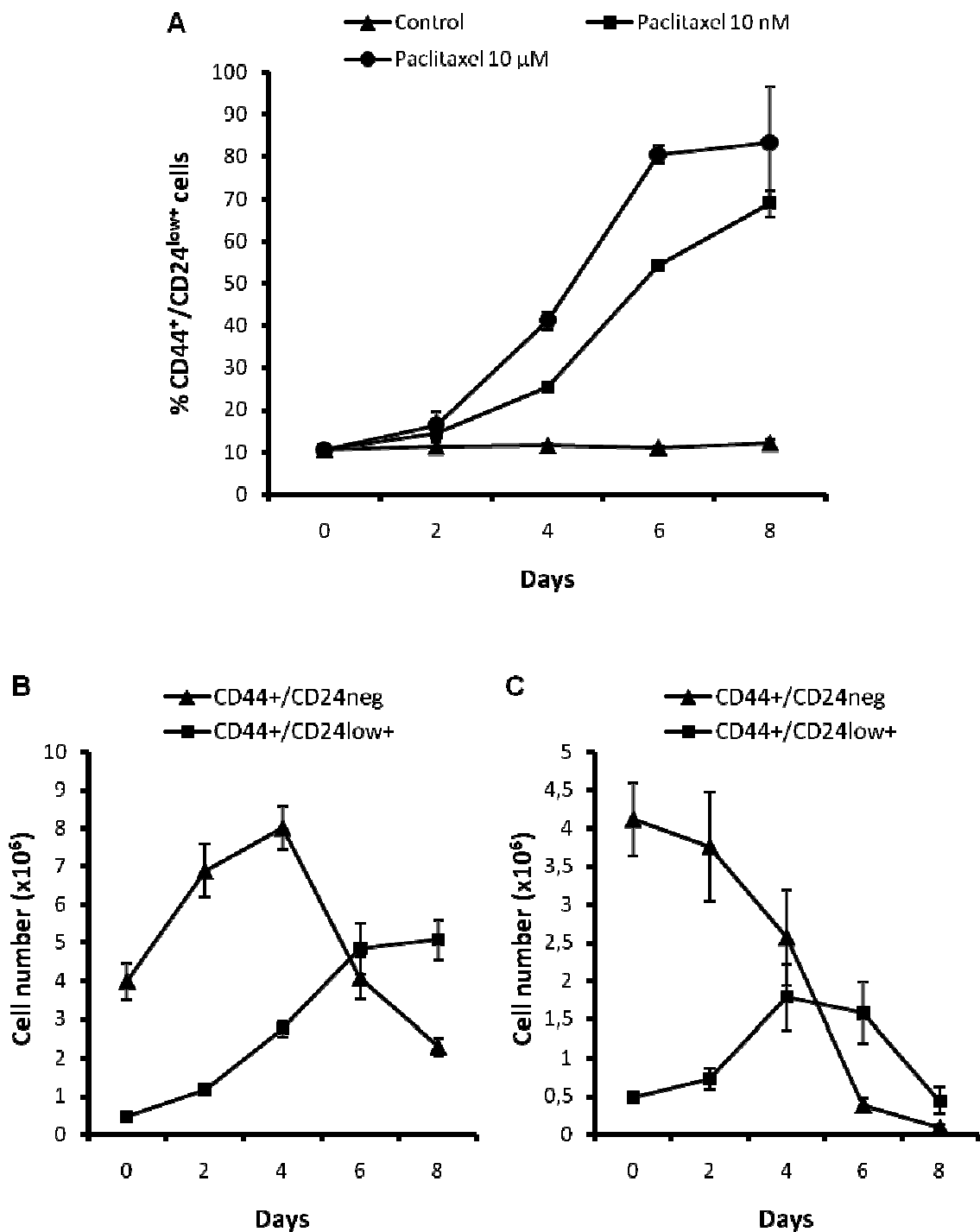


Figure 72. Variations in CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} subpopulations in cultures treated with Paclitaxel. (A) Percentage of cells CD44⁺/CD24^{low+} over time in MDA-MB-231 cells treated with 10 nM or 10 μM of Paclitaxel for 8 days. (B) Number of CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} cells in the cultures treated with 10 nM and (C) 10 μM of Paclitaxel for 8 days. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean ± SE.

the number of CD44⁺/CD24^{low+} cells continued increasing after 8 days (Figure 72). Moreover, when Paclitaxel was used at a concentration of 10 μ M, only CD44⁺/CD24^{low+} cells were able to increase in number, although finally their number decreased after day 4 (Figure 72).

Next, we studied the cell cycle profile of both subpopulations in MDA-MB-231 cells treated with 10 μ M of Paclitaxel, since this concentration was more effective reducing cell number. As it is shown in Figure 73, the response of each subpopulation to the treatment was very different. At day 2, the vast majority of cells were in G2/M phase for both subpopulations, but after 4 days of treatment CD44⁺/CD24^{low+} cells were still replicating and generating cells with a 8n DNA content. At day 8, the vast majority of cells in the cultures were apoptotic (represented by the large left peak in the histograms), however some CD44⁺/CD24^{low+} cells still showed a 4n and 8n DNA content (Figure 73).

All together these data indicate that Paclitaxel produce a cellular detention in G2/M phase of the cell cycle and finally induce cell death by mitotic catastrophe. On the other hand, CD44⁺/CD24^{low+} cells are more resistant to Paclitaxel treatment than CD44⁺/CD24^{neg}, suggesting that this therapy is not effective for CSC, since the concentration needed is too high and could be not secure for patients.

7.2. TREATMENT OF MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS WITH DAPT

7.2.1. INHIBITION OF THE NOTCH PATHWAY AND SOX2 EXPRESSION IN MDA-MB-231 CELLS EXPOSED TO DAPT

Notch pathway activation is mediated by γ -secretase enzymes, which are responsible for the proteolytic cleavage of the intracellular membrane domain of NOTCH receptor, releasing the active NICD into the cytoplasm (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011). To determine the ability of DAPT, a GSI, to inhibit Notch pathway, MDA-MB-231 cells were treated with DAPT for 15 days and, subsequently, was determined cleaved NOTCH1 in the cultures and compared with levels released by cells cultured in DMEM-FBS medium (control). SOX2 expression was also studied in order to determine its relation with this signaling pathway.

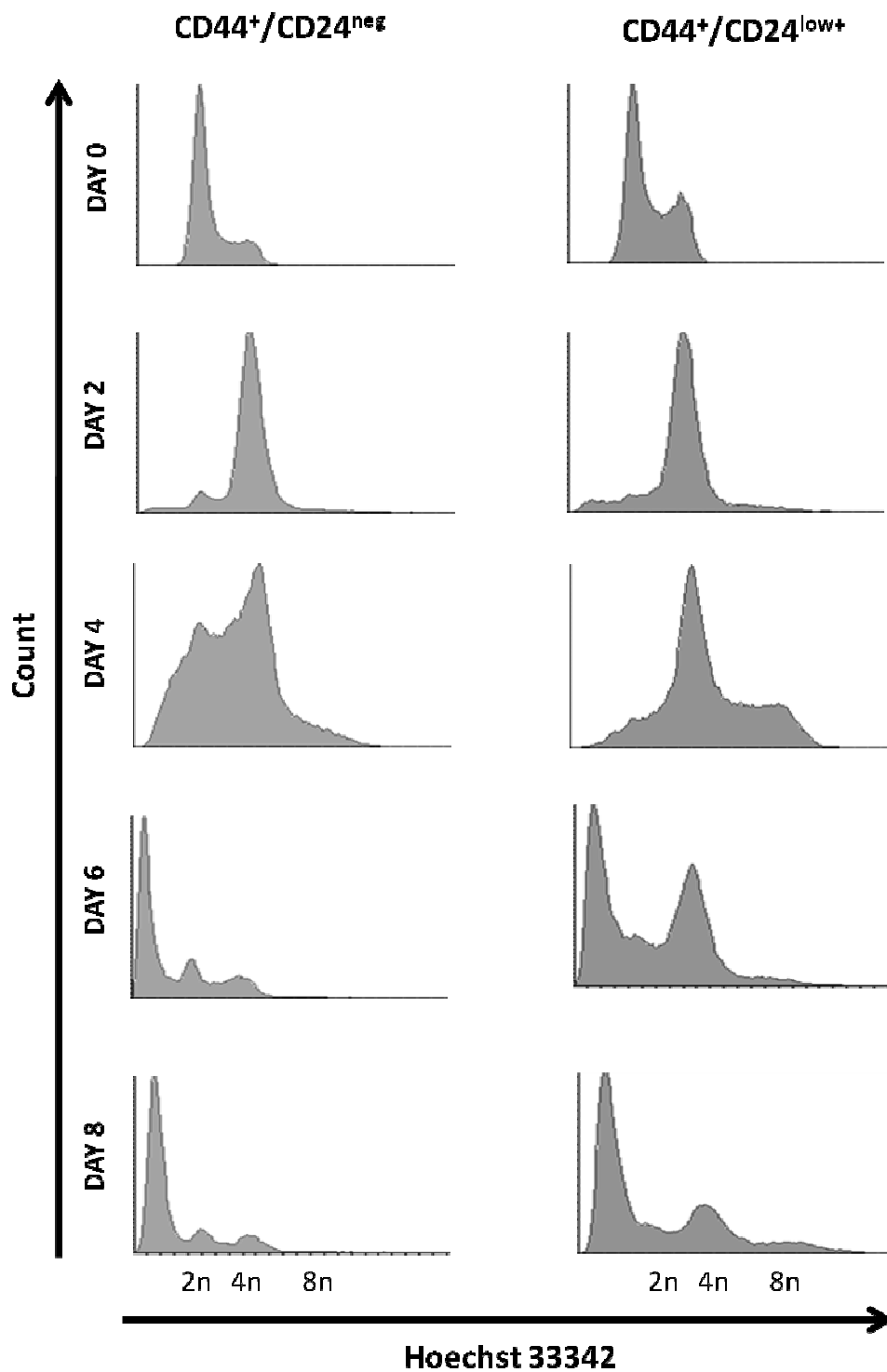


Figure 73. Cell cycle analysis for $CD44^+/CD24^{neg}$ and $CD44^+/CD24^{low+}$ cells in cultures treated with 10 μ M Paclitaxel. Cell cycle profile in $CD44^+/CD24^{neg}$ and $CD44^+/CD24^{low+}$ cells presents in MDA-MB-231 treated with Paclitaxel at different time points. DNA content corresponding to each peak is indicated at the bottom of the figures. Big peak on the left observed in both subpopulations at day 6 and 8 represents apoptotic cells.

Cells cultured in presence of DAPT drastically reduced cleaved NOTCH1 levels after 15 days, being not detectable by Western-Blot assays (Figure 74). SOX2 expression was also down-regulated in cells cultured with 5 μ M DAPT for 15 days when compared with levels released by cells cultured without DAPT (Figure 74). Hence, DAPT shows a great potential to inhibit NOTCH cleavage by γ -secretases and therefore, a large power to inhibit Notch pathway. Moreover, these results also suggest that SOX2 expression is mediated by Notch activation since its expression is down-regulated when cells were cultured for 15 days with DAPT and NICD was not activated.

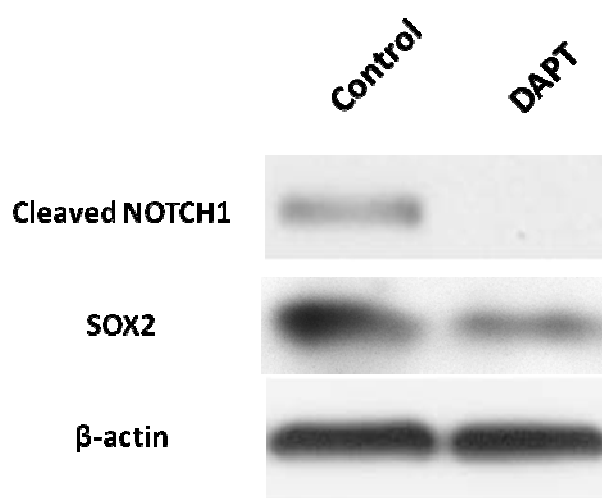


Figure 74. Western-Blot analysis for the expression of different proteins related with CSC phenotype in cells cultured until confluence. Expression levels of cleaved NOTCH1 and SOX2 in MDA-MB-231 cells treated with 5 μ M DAPT and cells cultured in DMEM-FBS medium without DAPT for 15 days. β -actin expression was used as housekeeping protein.

7.2.2. DIFFERENTIAL EFFECT OF DAPT ON CD44⁺/CD24^{neg} AND CD44⁺/CD24^{low+} CELLS

The therapeutic potential of the GSI known as DAPT was assayed on MDA-MB-231 cells, determining its effect on CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} subpopulations. After 15 days of treatment with DAPT 5 μ M, the percentage of CD44⁺/CD24^{low+} cells within the MDA-MB-231 cell cultures decreased significantly ($P < 0.05$) (Figure 75), suggesting that this subpopulation, which is enriched in cancer cells with stem cell-like properties, is more sensitive to this kind of therapies.

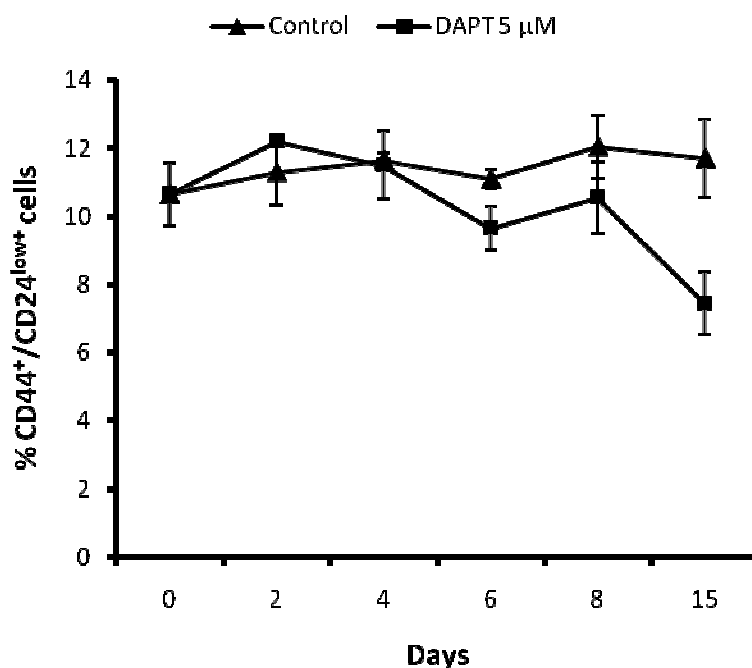


Figure 75. Effect of DAPT in the proportion of CD44⁺/CD24^{low+} cells. Percentage of CD44⁺/CD24^{low+} cells over time in the MDA-MB-231 cells cultured with and without DAPT for 15 days. All data were obtained from three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean \pm SE.

Cell cycle profile was studied for both subpopulations after 15 days of culture in the presence or absence of DAPT, in order to determine differences to the treatment with this GSI between CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} cells. No differences were observed in the cell cycle profile in CD44⁺/CD24^{neg} cells exposed to 5 μ M of DAPT for 15 days when compared with MDA-MB-231 cells cultured in DMEM-FBS medium without DAPT (control) (Figure 76). However, cell cycle profile of CD44⁺/CD24^{low+} cells observed in the cultures exposed to DAPT for 15 days differed from the control group. The proportion of cells in the S phase of the cell cycle for this subpopulation decreased after DAPT exposure in comparison with untreated cells and also showed a small peak on the left of the histogram which could represent pre-apoptotic cells, since the DNA content of them was less than the normal karyotype (Figure 76).

These data demonstrate that the DAPT treatment have no effect in CD44⁺/CD24^{neg} cells, suggesting that Notch activation is restricted to the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation and therefore, only this subpopulation is affected for

GSI. In conclusion, these results indicate that the use of GSI is a good targeted therapy against CSC, since $CD44^+/CD24^{low+}$ cells have been proved that posses more features associated to BCSC phenotype.

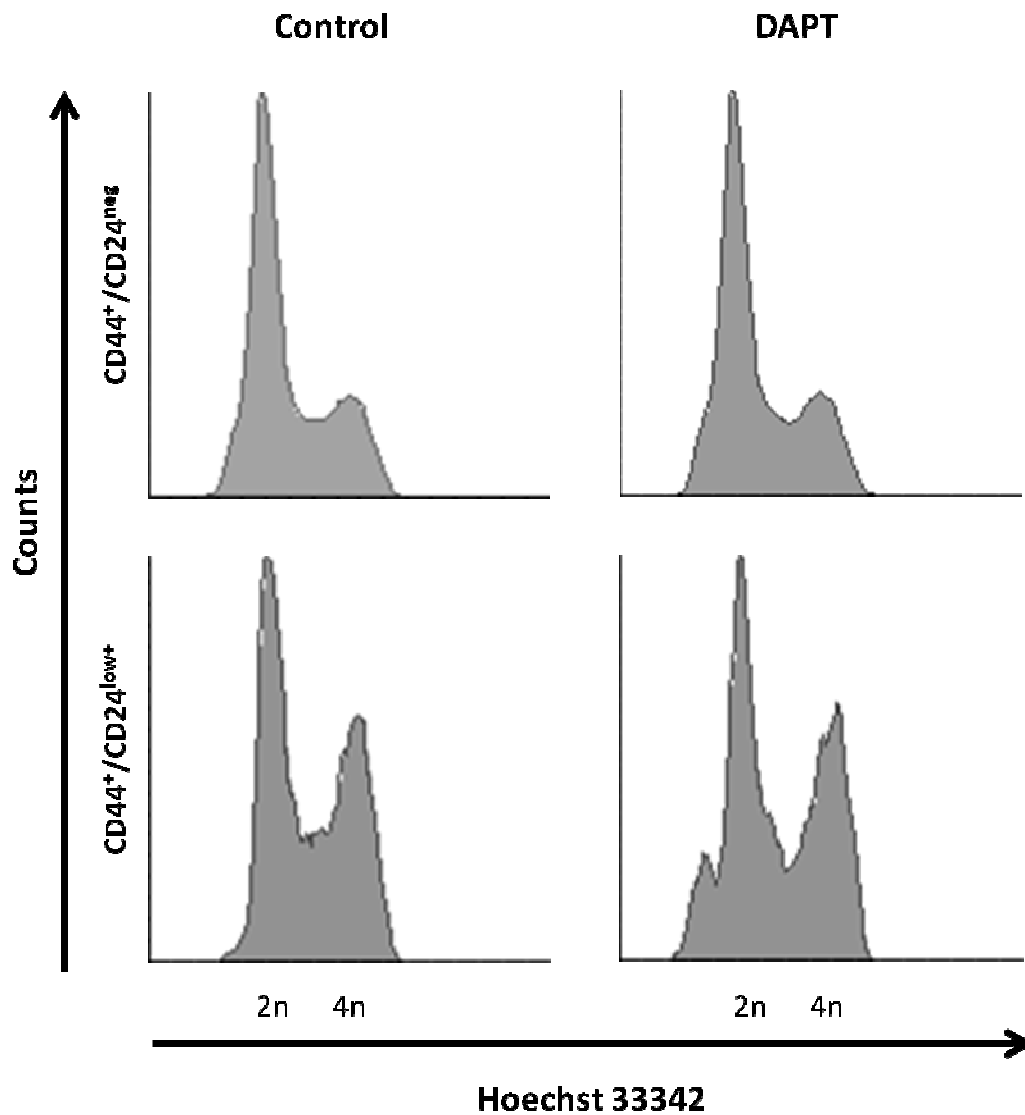


Figure 76. Effect of DAPT in the cell cycle of $CD44^+/CD24^{neg}$ and $CD44^+/CD24^{low+}$ cells. Cell cycle profile in MDA-MB-231 cells treated with DAPT for 15 days (right) and in cells cultured in the absence of this GSI. Left peak in the histograms represents cells in G1 phase (diploid DNA content, 2n), and right peak cells in G2/M phase (tetraploid DNA content, 4n). The space between both peaks corresponds to cells in S phase.

DISCUSSION

THERAPEUTIC POTENTIAL OF STEM CELLS

Cardiovascular disorders, such as the ischemic heart disease, stroke and peripheral arterial occlusive disease, cause an elevated morbidity and mortality in developed countries, and are responsible for generate high health costs (Leal et al., 2006; Mendis et al., 2011). One of the most relevant findings related to cell therapy for cardiovascular tissue regeneration was the identification of a cell population resident in the the bone marrow, known as EPC, capable to differentiate towards an endothelial phenotype (Asahara et al., 1999a; Asahara et al., 1997; George et al., 2011; Shi et al., 1998). EPC are mobilized into the bloodstream, attracted by various molecules released after AMI, in fact, ischemic tissues has been found to enhance EPC recruitment and to induce neoangiogenesis. (George et al., 2011). Furthermore, it has been demonstrated the ability of MSC, derived from bone marrow, to differentiate into endothelial cells, smooth muscle cells and cardiomyocytes (Quevedo et al., 2009). In addition, it has been shown that co-implantation of EPC and human MSC into immunodeficient mice results in the formation of extensive vascular networks after one week (Melero-Martin et al., 2008).

Currently, several clinical trials use different strategies for cell delivery and a diverse cell sources for transplantation in CVD. Most of these studies used autologous EPC isolated from peripheral blood or MSC harvested from bone marrow (Asahara et al., 2011; Wang et al., 2012c). These two cell populations have shown a remarkable ability to improve myocardial perfusion and contractile function, and to improve limb perfusion in patients (Matoba et al., 2008; Pasquet et al., 2009; Taljaard et al., 2010; Trachtenberg et al., 2011). However, the scarcity of EPC in adult tissues and the difficult isolation of MSC derived from bone marrow make their therapeutic use a challenge. (Asahara et al., 2011; Behr et al., 2010). Moreover, various clinical factors associated with patients who suffer CVD, such as aging, diabetes, hypercholesterolemia, hypertension or smoking, has been shown to reduce the number and biological activity of circulating EPC and MSC population of bone marrow. This fact, probably represent the major limitation for autologous transplantation (Alt et al., 2012; Asahara et al., 2011; Neef et al., 2012).

It has been shown that adipose tissue contains a population of adult multipotent cells with properties similar to bone marrow derived MSC, named hASC, which are

able to differentiate into several lineages, including EC, smooth muscle cells, and cardiomyocytes (Halvorsen et al., 2001; Mitchell et al., 2006; Zuk et al., 2001). This cell population shows certain advantages over bone marrow MSC because it can be isolated in large quantities by a simple surgical procedure that involves little discomfort or risk to the patient, and have greater proliferative capacity *in vitro*. Consequently, adipose tissue could be an optimal SC source for application in both autologous and allogeneic transplantation (Behr et al., 2010; Iwashima et al., 2009). In fact, hASC are presently been used in several clinical trials for treatment of CVD (Mizuno et al., 2012; Qayyum et al., 2012).

From a therapeutic standpoint, it becomes necessary the isolation of sufficient numbers of progenitor cells capable of maintaining their angiogenic potential *in vitro* for long periods. Here, we have presented a simple and reproducible approach to isolate and maintain ME-LC obtained from subcutaneous adipose tissue. Moreover, we demonstrated the capacity of ME-LC to differentiate into both endothelial and cardiomyocyte-like cells, which could have advantages in the stem cell-based cardiovascular therapy.

ME-LC isolation from hASC cultures

Phenotypic characterization of hASC isolated from lipoaspirates showed a high expression of mesenchymal specific surface markers such as CD105, CD73 and CD90, and barely expressed hematopoietic stem cells (HSC) or EPC markers (CD45, CD34, CD133, CXCR4 or KDR). Moreover, hASC possessed the ability to differentiate into various lineages as previously shown (Behr et al., 2010; Ghorbanian et al., 2012). The existence in the adipose tissue of an abundant cell population with similar characteristics and properties to MSC, may be due to the high vascularity of this tissue, since several studies indicate that these cells reside *in vivo* in the vascular pericytes population that are found around the capillary endothelial cells and microvessel (da Silva Meirelles et al., 2008; Phinney, 2012; Zhang et al., 2012c).

hASC cultured in serum-free media for 3 weeks resulted in the appearance of SCF with a morphology similar to embryoid bodies of ESC cultures. SCF increased in number and size throughout the subsequent culture stages, as described before (Martinez-Estrada et al., 2005). When cells were cultured in SFO3 medium (stage III)

and in EC medium (EGM-2; stage IV), both termed ME-LC, increased their expression of EPC and hematopoietic markers (CD34, CD133, KDR, CXCR4 and CD45). SFO3 medium was developed by Hirashima et al. for HSC culture, demonstrating that this chemically defined serum-free culture system, including 2- β -mecerptoethanol, had the ability to support the proliferation of EC and their progenitors from mesoderm cells. (Hirashima et al., 2003).

The co-existence of hematopoietic and endothelial markers in the ME-LC is indicative of a phenotype resembling early vascular progenitors, since it has been reported the existence of a bipotent precursor cell, termed the hemangioblast, capable of giving rise to both hematopoiesis and vascular endothelium (Papayannopoulou, 2004; Schatteman et al., 2007). In contrast, mature EC HUVEC were negative for CD34 and CD133 progenitor markers and strongly positive for CD31, a mature endothelial marker. These antigens (CD34 and CD133) are lost upon differentiation of endothelial progenitors to endothelium (Hirashima et al., 2003)

CD34 expression in hASC is correlated with replicative capacity, differentiation potentials, expression profiles of angiogenesis-related genes, and immaturity or stemness of these cells (Suga et al., 2009). hASC in the early stages of culture did not express CD34, in agreement with some studies that proved that hASC express CD34 *in vivo*, but not always *in vitro* (Lin et al., 2012). However, when the hASC were cultured in free serum SFO3 media, there was an increase in the expression of CD34. It has been found that cells isolated from aorta postnatal tissue and grown in serum free medium present a population of induced CD34 positive cells, the expression of this marker disappears when cells are cultured in medium supplemented with serum (Howson et al., 2005).

In ME-LC cultures it was also observed an increment of the hematopoietic marker CD45. In this regard, it has been proved that hematopoietic progenitors cells can be derived from hASC (De Toni et al., 2011). In addition, several studies indicate that populations isolated from blood EPC with CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ phenotype also express CD45, having established a common origin between them and hematopoietic progenitors (Prater et al., 2007). Furthermore, ME-LC expressed endothelial markers such as CXCR4 and KDR, which were highly expressed in HUVEC, even though these

are not unique surface markers of mature EC, since it has also been seen that they are expressed in HSC (Asahara et al., 2011).

The presence of both hematopoietic and endothelial markers in cells obtained from SCF grown in SFO3 media, suggests that these cells aggregates may not only have a morphological similarity to the embryoid bodies. A recent study has shown that mesodermal precursors, derived embryoid bodies, under certain culture conditions, may be committed to a hemato-endothelial and cardiac differentiation (Zhu et al., 2012). In agreement with our study, the increased expression of endothelial lineage markers, showed in hASC cultured under serum deprivation, has proved before. For example, similar results were obtained by Martínez-Estrada et al. They showed that cell aggregates from hASC grown in serum-free HSC media expressed KDR, although, they did not found expression of others markers such as CD133, CD34 and CD45 (Martínez-Estrada et al., 2005). In addition, it has been shown that bone marrow-derived MSC cultured in absence of serum promotes angiogenesis (Oskowitz et al., 2011).

When ME-LC were cultured on a collagen matrix IV with EGM-2 medium they showed a high proliferation rate and a typical morphology of EPC. These cells forming multidimensional colonies including a mixed morphology of rounded aggregates associated with adherent cells with elongated shape, unlike to EC which grew as monolayers *in vitro*, and exhibiting a cobblestone morphology (Hirschi et al., 2008). Additionally, these cultures maintained EPC markers expression such as CD34, CD133 and KDR, showing a stable expression of mature EC markers such as CD31. Similar results have been observed in MSC obtained from amnion and cultured in EGM-2 medium, demonstrating that this type of culture induces the angiogenic potential of MSC, but without inducing their complete differentiation into mature EC (Konig et al., 2012). However, Martínez-Estrada et al. observed that further culture in EGM-2 medium of KDR⁺/CD133⁻/CD34⁻/CD45⁻ cells, previously obtained in serum free medium, induced their differentiation into mature EC (Martínez-Estrada et al., 2005). The slight controversy between these results and those shown in our study may be due to variations in the period of time that cells were cultured under serum deprivation conditions, as it has been observed that serum components can affect the maturation of cultured cells (Royer et al., 2006).

In our work we show a high expression of CD73 or CD105 markers throughout the process. It has been demonstrated that these markers are not exclusive for mesenchymal cells, being also expressed in cells of endothelial lineage. In fact, CD73 has been involved in regulation of vascular permeability, maintenance of the endothelial barrier function, adaptation to hypoxia, ion and fluid transport and regulation of inflammatory responses in the extracellular medium (Colgan et al., 2006). Recently it has been determined that expression of CD73 can be used to differentiate between non-hemogenic endothelial progenitors and hemogenic endothelial progenitors derived from human pluripotent SC, being this expression associated with non-hemogenic EPC phenotype (Choi et al., 2012). Moreover, CD105 is also expressed on endothelial cells with high proliferative capacity and HSC, which is related with the endothelial development and hematopoietic process that occurs from hemangioblast (Roques et al., 2012).

In addition, the mesenchymal marker CD90, whose expression was practically absent in HUVEC, was the marker that significantly decreased when ME-LC were cultured in SFO3 medium (stage III), suggesting their commitment to an endothelial lineage differentiation. In agreement, it has been observed that MSC cultured in medium supplemented with angiogenic factors and low serum suffer a loss of CD90 expression, inducing angiogenic differentiation but without experimenting a complete endothelial maturation (Campioni et al., 2008). In contrast, CD90-positive cells recovered at stage IV in which cells reached a high rate of proliferation. It has been shown that the expression of CD90 on EPC and pericytes may be indicative of their angiogenic potential and their proliferative capacity (Bagley et al., 2005). Furthermore, it has been observed that CD34⁺/CD90⁺ cells obtained from hASC show a high potential to form sphere cell aggregates, are capable of differentiating into an endothelial phenotype and show higher ability to form capillary-like structures *in vitro* (De Francesco et al., 2009). However, these contradictory results need to be addressed in future experiments in order to clarify the real role of CD90 in the endothelial differentiation process.

Gene expression profile showed the expression and maintenance of specific genes involved in self-renewal and cell cycle promotion as has been recently showed in cord blood-derived EPC, confirming the endothelial progenitor phenotype. Both *CXCR4* and *CD133* vascular genes were expressed at similar levels throughout the

distinct culture stages. Nevertheless, genes expressed in differentiated EPC such as *CDK2* and *FLT-1* (Igreja et al., 2008) showed a weak expression level in ME-LC cultured in SOF3 medium. Another interesting result was the disappearance of *TIE-2* gene expression, which has been previously reported as angiogenic factor clearly induced in the differentiated EC (Furuhata et al., 2007). Constitutive *ANG1-TIE2* signaling is thought to maintain the quiescent endothelial phenotype *in vivo* (Saharinen et al., 2010). In addition to EC, *TIE-2* is expressed in a subpopulation of HSC being, in part, responsible of maintaining a quiescent state in the bone marrow niche (Gomei et al., 2010). In addition, *CCR7* expression, which is related with an EPC phenotype (Igreja et al., 2008), was also maintained in ME-LC, although with a little decrease in SFO3 cultures. More interestingly, *DLL4* (a NOTCH ligand) was not expressed in ME-LC, and it is thought that its expression acts as a switch blocking endothelial cell proliferation and allowing induction of a more mature differentiated phenotype (Harrington et al., 2008).

Angiogenic potential of ME-LC

Our results show the angiogenic capacity of the isolated ME-LC. *In vitro* experiments demonstrated the ability of this cell population to form structures like vessels when grown on Matrigel™ in the presence of VEGF, in agreement with other studies (Colazzo et al., 2010).

VEGF is known to be the main activator of angiogenesis (Lee et al., 2007). *In vivo* VEGF is produced by EC (Ferrara, 2010) and its principal function consists in inducing proliferation and differentiation of EPC to EC in neovascularization sites (Ceradini et al., 2008). Moreover, despite the fact that MSC not express VEGFR, it has been recently identified that VEGF-A can stimulate their endothelial differentiation and the formation of tubular structures *in vitro*, being an essential role in this process PDGFR, which is expressed in MSC (Ball et al., 2007).

Also, the expression of the NOTCH ligands *DLL4* was down-regulated in ME-LC, which correlated with the early formation of large number of capillary-like structures and the late formation of a vascular network. Recent studies have demonstrated that *DLL4* limits the angiogenic potential in developing blood vessels and the loss of *DLL4* results in an arterial hyperbranching phenotype (Hogan et al., 2009). It has been shown

that VEGF stimulation of HUVEC induces DLL4 expression which reduced vessel sprout length in a 3D tubulogenesis assay confirming that DLL4 signaling inhibits angiogenesis (Harrington et al., 2008).

In our study, ME-LC showed an increased secretion of SDF-1 in comparison with the original population of hASC, or even with hASC seeded into Matrigel™. This is consistent with the pro-angiogenic effect of this cytokine observed *in vitro* in EPC (Zemani et al., 2008). SDF-1 acts via its receptor CXCR4, mobilizing EPC towards sites of ischemia (Oh et al., 2010), therefore, ME-LC may also participate indirectly in vascular regeneration by SDF-1 production and mobilizing EPC from bone marrow.

We also demonstrated here that ME-LC, which express CXCR4, were able to migrate toward a SDF-1 gradient. Furthermore, ME-LC migrated to pro-angiogenic growth factors, VEGF and HGF, which synergistically enhance angiogenesis and neovascularization as has been demonstrated recently (Golocheikine et al., 2010). These data suggest the potential homing of ME-LC to sites of vascular injury for tissue repair and its possibility of clinical use for vascular regeneration.

Capacity of ME-LC to differentiate into cardiomyocyte-like cells

After exposure to 5-aza, ME-LC showed the capacity to differentiate into cardiomyocyte-like cells with the acquisition of a cardiogenic phenotype and the expression of cardiomyocyte-specific markers. Immunofluorescence staining showed that these cells were positive for Desmin, Troponin T and α -Actinin, which are markers widely used to confirm the cardiac differentiation (Gaustad et al., 2004; Haghani et al., 2012; Labovsky et al., 2010).

Desmin is a medium filaments protein which is extensively spreads over skeletal muscle, cardiac muscle, smooth muscle and muscle epithelium, constituting the major part of actin filaments in muscle cells (Cao et al., 2004). Desmin expression is considered an early marker of myogenic differentiation (Haghani et al., 2012). On the other hand, Troponin T and α -Actinin are expressed in terminally differentiated cells (Gaustad et al., 2004; Haghani et al., 2012). Their patterns of expression in the cytoplasm were different from Desmin, distributed by way of pellets. Troponin T is one

of the three polypeptide subunits of troponin, and cardiac isoform is exclusive of the heart muscle, and hence, is used as a cardiac marker (Wei and Jin, 2011), while α -Actinin is a component of the Z-bands in skeletal and cardiac muscle sarcomeres, and its expression is indicative of myofibrillogenesis (Wang et al., 2012a). Therefore, our results agree with others authors that have shown the ability of MSC derived from bone marrow and adipose tissue to differentiate toward cardiomyocyte-like cells (Gaustad et al., 2004; Gneccchi et al., 2012).

Troponin T expression was confirmed by flow cytometry, and was also showed that ME-LC exposed to 5-aza expressed cardiac Troponin I and MYL2. Regarding these cardiac markers, it is well known that the expression of sarcomeric α -Actinin, cardiac Troponin I and MYL2 indicate complete sarcomeric organization (Labovsky et al., 2010). In addition, these cells expressed nuclear Lamin A/C, which is a marker of terminally differentiated cells, being activated its expression during human ESC differentiation before downregulation of the pluripotency marker OCT-3/4 (Constantinescu et al., 2006; Gaustad et al., 2004).

The interest of our study was the use of hASC isolated from liposuction, which is a less invasive method than bone marrow aspiration and allows the collection of a high rate of progenitor cells. This can overcome the limited proliferation potential of mature EC and EPC, which hampers their clinical use. These data indicate that ME-LC have the capacity to maintain their vascular progenitor properties. ME-LC increased the secretion of SDF-1, formed vascular-like structures, and displayed the ability to migrate toward a cytokine gradient. Moreover, ME-LC retained the capacity to differentiate into cardiomyocyte-like cells, showing expression of typical cardiomyocyte markers. These properties suggest the potential of ME-LC to recellularize damaged tissue or strengthen the post-infarct scar as well as inducing neovascularization of the affected area, which could have advantages in the stem cell-based cardiovascular therapy.

CLINICAL IMPLICATIONS OF CANCER STEM CELLS

Tumours are composed of a heterogeneous population of cells, within which resides a small population of cancer cells that are exclusively responsible for the growth and propagation potential of the whole tumour. These cells have been named CSC since they possess many biological features similar to normal SC. Based on

functional and immunophenotypic analysis of cell subpopulations, cancer has become viewed increasingly as a stem-cell disorder (Huntly and Gilliland, 2005). In this sense, the fact that SC are undifferentiated long-lived cells with distinctive properties of self-renewal and clonogenicity, may render them prone to generate cancers by consecutive accumulated mutations that are crucial for malignant transformation and tumour initiation (Kucia and Ratajczak, 2006; Piscaglia, 2008). Moreover, the oncogenic process could be more efficient in this cell population as it may borrow from these cells their intrinsic machinery in the regulation of self-renewal, quiescence and resistance to insults, so the oncoproteins do not have to create these mechanisms because they are already in place (Ghaffari, 2011).

Actually, there are a number of studies that show that CSC can be generated by oncogenic transformation of SC progeny, and that some SC types, such as ESC and iPS cells, tend to form teratomas and have a high risk of malignant transformation (Ben-David and Benvenisty, 2011; Chen et al., 2012a; Ghaffari, 2011). However, it is important to note that the cell of origin, the normal cell that acquires the first cancer-promoting mutation, is not necessarily related to the CSC, the cellular subset within the tumour that uniquely sustains malignant growth. That is, the cell-of-origin and CSC concepts refer to cells that are capable to initiate cancer and cells responsible for cancer propagation, respectively. Although the TIC and the CSC have been used interchangeably, the TIC more aptly denotes the cell of origin (Visvader, 2011).

CSC have been identified in different tumours, included breast and colon cancers (Hermann et al., 2010; O'Brien et al., 2009), being characterized by tumorigenic properties and the ability to self-renew, form differentiated progeny, and develop chemo-resistance and radio-resistance that lead to the failure of traditional therapies. Eradicating CSC, has been thought as a promising approach to improve cancer survival or even to cure cancer patients, and therefore, the adequate identification of these CSC has important clinical implications (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011). However, the difficulty of isolating sufficient CSC from primary cancers to permit their molecular characterization has hampered efforts to define targetable nodes critical for CSC survival, self-renewal vs differentiation, therapeutic resistance and metastasis. For this purpose, cell lines have been used widely since they represent polyclonal populations of cells that have adapted to tissue culture conditions, but retain many of their phenotypic and genotypic properties over countless

passages, and contain analogous hierarchical differentiation programs to those found in primary tumours. These properties make immortalized cell lines a good model to study cancer biology and to establish techniques that can facilitate the characterization of regulatory pathways of CSC, and identify potential SC markers and therapeutic targets (Charafe-Jauffret et al., 2009; Fillmore and Kuperwasser, 2008).

The fact that CSC possess specific properties different from other tumour cells make possible their isolation (O'Brien et al., 2009; Talmadge and Fidler, 2010). Different strategies have been developed for the isolation and characterization of these cells, such as the expression of specific cell surface markers, the ability to efflux the fluorescent dye Hoechst 33342, the high activity ALDH, the capacity to form floating spheres, and even their different adhesion capability (Hermann et al., 2010; Lorico and Rappa, 2011; Vaiopoulos et al., 2012; Vira et al., 2012; Walia and Eible, 2010). In order to test the efficacy of these methodologies for CSC isolation, we performed a series of studies with different breast and colon cancer cell lines.

Isolation and characterization of CSC from breast and colon cancer cell lines

One of the most used methods for the isolation of CSC is based on the expression of specific cell surface markers. Diverse combinations of markers have been proposed to the identification of CSC from different tumour types. For example, it has been shown that CD44⁺/CD24^{-/low} breast cancer subpopulations are enriched for CSC (Al-Hajj et al., 2003), but the relative contributions of CD44⁺ CD24 negative versus low subpopulations are poorly defined. In this sense, we isolated and characterized phenotypic and functionally the cellular subpopulations CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} from MDA-MB-231 cells to determine the tumorigenic potential of each one. MDA-MB-231 is one of the most widely used breast cancer cell line in cancer research due to its plasticity, invasive phenotype and high metastatic potential (Kim et al., 2009; Minn et al., 2005), and recently determined that resemble the claudin-low subtype (Prat et al., 2010).

Phenotypic characterization of this cell line by flow cytometry showed a high population of CD44⁺CD24^{-/low} cells, as has been shown previously in different breast cancer ER⁻ (Charafe-Jauffret et al., 2009; Fillmore and Kuperwasser, 2008). Interestingly, when CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} cells were sorted by FACS

was observed that both subpopulations possessed different properties. The minor CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation in MDA-MB-231 gave rise to CD44⁺/CD24^{neg} and CD44⁺/CD24^{low+} cells, with kinetics compatible with close to semi-conservative growth. However, CD44⁺/CD24^{neg} yield only CD44⁺/CD24^{neg} progeny. Moreover, cell cycle profile showed that both subpopulations were actively cycling, although CD44⁺/CD24^{low+} showed a significant increase in the proportion of S phase than CD44⁺/CD24^{neg}. Seeded at equal cell number, the subpopulation CD44⁺/CD24^{low+} yielded more and larger mammospheres and soft agar colonies than CD44⁺/CD24^{neg}, being these characteristics associated with a BCSC phenotype (Hwang-Verslues et al., 2009). All these data suggest that CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation has more tumorigenic potential than CD44⁺/CD24^{neg}.

In this sense, surface CD24 expression is observed in CSC enriched populations in colon (Yeung et al., 2010) and pancreatic cancers (Li et al., 2007). Moreover, a recent study found higher CD24 in metastatic nodes than in primary bladder cancers, and showed that loss of CD24 reduced experimental lung metastasis (Overdevest et al., 2011). In hepatocellular carcinoma, a CD24⁺ subset of CD90⁺ progenitors, enriched by cisplatin exposure, generated more and larger tumour spheres, and showed increased tumorigenicity and capacity to generate metastasis (Lee et al., 2011). CD90⁺/CD24⁺ cells also gave rise to CD90⁺/CD24⁻ and STAT3-driven NANOG expression was implicated in their high self-renewal. Regarding to breast cancer, MaSC show a positive expression of CD24 (Pece et al., 2010), and increased CD24 surface and cytoplasmic expression has been associated with breast and bladder cancer metastasis and poor outcome (Athanasiadou et al., 2009; Bircan et al., 2006). In addition, Vassilopoulos et al. observed that purified CD24⁺/CD29⁺ cells from breast cancer could differentiate and reconstitute the heterogeneity found in parental cells when plated as a monolayer. Under low-attachment conditions, they detected “tumourspheres” only in the presence of double positive cells, which maintained their ability to self-renew (Vassilopoulos et al., 2008). Regarding to the high proliferation rate observed for CD44⁺/CD24^{low+} cells, different studies have shown that CSC are able to entry in a quiescence state (Li and Bhatia, 2011). However, culture conditions and their high self-renewal capacity may contribute to increase their cellular division *in vitro*.

Another characteristic of CSC, which has been extensively used for their isolation and characterization, is the ALDH activity. It has been shown that a high ALDH activity is associated with normal and malignant SC phenotypes (Ma and Allan, 2011). In order to determine the relation between ALDH activity and cell surface markers expression associated to CCSC, we carried out FACS for isolate ALDH⁺ and ALDH⁻ subpopulations from T-84 cells. In addition, we used a system of suspension culture with specific media, since it has been more efficient to maintain SC features *in vitro* than adherent cultures (Dey et al., 2009). This human colon cancer cell line was selected for this assay because is a well-differentiated carcinoma cell line (Ao et al., 2011), and therefore is easier to determine changes in cell surface antigens expression.

T-84 cells sorted for high ALDH activity showed a high increased expression of CD133, CD44 and EpCAM than unsorted population, while the expression of these markers was lower in ALDH⁻ subpopulation cultured under the same conditions. CCSC are usually characterized for the positive expression of cell surface markers CD133, CD44 and EpCAM (Dalerba et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). CD133 expression in CSC has been related with cellular motility and the ability to form spheres (Elsaba et al., 2010; Kusumbe et al., 2009; Vaiopoulos et al., 2012); while CD44 is a cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion glycoprotein, which modulates adhesiveness, motility, matrix degradation, proliferation and cell survival (Marhaba and Zoller, 2004). Regarding to EpCAM, it has been demonstrated that this surface protein has oncogenic potential and is activated by release of its intracellular domain, which can signal into the cell nucleus by engagement of elements of the Wnt pathway (Munz et al., 2009). Moreover, the percentage of cells in the cultures that expressed CD133, CD44 and EpCAM was equal than the percentage of ALDH⁺ cells, suggesting that these markers are only expressed in this subpopulation. These data are in concordance with a study where ALDH⁺ cells were selected for a second marker, CD44 or CD133 expression, and was observed only a modest increased enrichment based on tumor-initiating ability (Huang et al., 2009).

The increased expression of these markers in sorted ALDH⁺ cells suggests that this subpopulation was enriched in cancer cells with stem cell-like phenotype. In this sense, it has been shown that ALDH⁺ cells isolated by flow cytometry from colon cancer, are able to generate tumours when are implanted only 25 cells in NOD/SCID

mice (Huang et al., 2009). In addition, a high ALDH activity has been also associated with CSC features in other cancer types, such as breast (Ginestier et al., 2007), prostate (Nishida et al., 2012), lung (Jiang et al., 2009a), head and neck (Clay et al., 2010) or sarcoma (Lohberger et al., 2012).

On the other hand, unsorted cells cultured as colonospheres also increased levels expression of CD133, CD44 and EpCAM. Previously, in a study developed by Kanwar et al., was shown that colonospheres formed *in vitro* exhibit higher expression of CCSC markers LGR5, CD44, CD166 and Musashi-1 along with putative CSC marker EpCAM, compared to the corresponding parental cancer cells. Furthermore, these cells also exhibit the ability to form spheroids under extreme limiting dilution, indicating the predominance of CSC in colonospheres (Kanwar et al., 2010). In addition, similar results have been observed in other cancer types, such as breast cancer (Rappa et al., 2008). Therefore, combination of different methodologies for the isolation of CSC, such as sorter for high ALDH activity and culture as colonospheres, may be more adequate for a better selection of this cancer cell subpopulation.

Recently, it has been proposed a new strategy for the isolation of BCSC based on their different adherence to plastic surface (Walia and Elble, 2010). In order to demonstrate if this methodology is valid for any tumour type, we developed a series of studies with the well-differentiated human breast cancer cell line MCF-7 (Kasper et al., 2007) and with two human colon cancer cell lines, T-84 which is a well-differentiated carcinoma cell line (Ao et al., 2011) and HT-29 which is a largely undifferentiated cancer cell line when is cultured in glucose-containing medium (Thomson et al., 1997). In addition, cells were cultured in suspension to enhance the potential isolation of CSC.

MCF-7 cells isolated by differential trypsinization showed a markedly increment of the cellular subpopulation CD44⁺/CD24^{low+} and a higher SP fraction in trypsin-sensitive MCF-7 cells. In regard to the ability to efflux Hoechst 33342, it has been demonstrated that MCF-7 SP have increased expression of ABCG2 and increased resistance to mitoxantrone compared to the non-SP cells, showing CSC features (Britton et al., 2012). Furthermore, these cells also exhibited higher ability to form spheroids under extreme limiting dilution, indicating the predominance of CSC in the trypsin-sensitive subpopulation based on self-renewal ability. Regarding to T-84 cell line, trypsin-sensitive cells showed a great increase in ALDH activity, which is

associated with CSC phenotype (Huang et al., 2009). More interestingly, these cells generated more xenograft tumours and with shorter latency than the original population when were injected into NOD/SCID mice, and were able to recapitulate the initial heterogeneity based on ALDH activity. On the other hand, although HT-29 expressed high levels of CD133, CD44 and EpCAM, their expression were increased in the trypsin-sensitive subpopulation. In addition, these cells showed a great enhance in ALDH activity. All together, these data showed an increase in CSC characteristics within the trypsin-sensitive subpopulation both in breast and colon cancer cells.

The enrichment of cancer cells with stem cell-like properties in cells which show low adherence to plastic surface may be due to an EMT process, since this change down-regulate cell–cell junctions (Walia and Elble, 2010). In this sense, it has been observed that cancer cells which undergo this EMT become invasive and drug-resistant (Peinado et al., 2007). Therefore, cells selected by differential trypsinization may be CSC that are involved in metastasis.

In conclusion, we prove here that a set of diverse methodologies developed to the isolation of CSC, produce enrichment in cancer cells with CSC features. However, given the heterogeneity that is evident among patients and the context dependence of some markers, CSC markers should be confirmed in functional assays in each patient under each experimental circumstance. Erroneously, many studies have assumed that CSC markers discovered in earlier studies are universally able to distinguish tumorigenic from non-tumorigenic cells, even in independent patient cohorts or in cultured cell lines (Magee et al., 2012). Hence, more studies are still needed to search for new markers and to test combination of different methodologies in order to isolate prospectively this CSC subpopulation.

Role of pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines in CSC biology

Microenvironment play a crucial role in tumorigenesis and cancer progression. In this sense, it has been observed that there is a strong link between obesity and breast cancer, and this may be caused because obese adipose tissue is a mediator of chronic inflammation (Itariu et al., 2012). So, adipocytes contact with cancer cells would synergistically increase local IL-6, IL-8, CCL2, CCL5 and IP-10 (Guzik et al., 2006; Keophipath et al., 2010; Vona-Davis and Rose, 2009). Furthermore, increased IL-8,

IL-6, CCL2 and CCL5 expression in breast cancers correlates with advanced stage, reduced differentiation and poor outcomes; and increased circulating cytokines levels has been associated with worse prognosis (Chavey et al., 2007; Nicolini et al., 2006; Soria and Ben-Baruch, 2008; Waugh and Wilson, 2008). In addition, it has been observed that IL-6 and CCL2 attract monocytes and CCL5 reduces antitumour immunity (Guzik et al., 2006; Mishra et al., 2011; Naugler and Karin, 2008; Vona-Davis and Rose, 2009). In order to determine the relation between pro-inflammatory cytokines secreted by cancer cells and cancer-associated cells and the acquisition of a CSC phenotype, we studied the effect of these cytokines in the human breast cancer cell line MDA-MB-231.

MDA-MB-231 cells exposed to different pro-inflammatory cytokines showed an increased proportion of cells expressing stem cell markers with a phenotype CD44⁺/CD24^{low+}, and yielded a high number of colonies in soft agar and mammospheres in suspension cultures, two hallmarks of BCSC (Hwang-Verslues et al., 2009). However, CD44⁺/CD24^{neg} cells were not affected by the above cytokines. On the other hand, cytokines exposure did not affect cell cycle profile. Therefore, these cytokines induced an increase in the more tumorigenic CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation, suggesting that this enrichment in cancer cells with stem cell-like features was due to an increase in the semi-conservative division rate of this subpopulation. In agreement with our results, it has been shown that IL-6, IL-8, CCL2, CCL5 and IP-10, produced by tumour associated macrophages and cancer cells, promote xenograft growth and metastasis *in vivo*, often without increased proliferation in culture (Bendre et al., 2002; Benoy et al., 2004; De Larco et al., 2001; Inoue et al., 2000; Luca et al., 1997; Qian et al., 2011). In addition, it has been observed that IL-6 and CCL5 secreted by adipocytes and MSC integrated into the tumour-associated stroma act in a paracrine fashion on the cancer cells to enhance their motility, invasion and metastasis (Dirat et al., 2011; Karnoub et al., 2007).

On the other hand, MDA-MB-231 cells exposed to the above cytokines showed an activation of the Notch signaling pathway, and an increase in c-MYC and SOX2 expression, which are involved in CSC self-renewal. The Notch signaling plays a key role in cell differentiation, survival, proliferation and self-renewal through diverse mechanisms, and is also involved in vasculogenesis and angiogenesis (Guo et al., 2011; Reedijk et al., 2008). It was reported that NOTCH1 induces the expression of c-

MYC, in addition, both proteins regulate the expression of same target genes participating in cell growth regulation (Palomero et al., 2006). c-MYC was also revealed to be the down-stream target of WNT/ β -Catenin signaling (Guo et al., 2011; Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011) and further studies showed that the distal WNT/ β -Catenin responsive enhancers are aligned with the c-MYC promoter through large chromatin loops (Yochum, 2011), revealing a possible regulatory mechanism of Wnt signaling on c-MYC. Regarding to SOX2, extensive studies revealed that SOX2 regulates the complex transcriptional network to maintain the unique characteristics of SC and the anti-apoptotic properties of CSC (Jia et al., 2011). SOX2 knockdown in CSC suppresses tumour growth and metastasis of lung cancer (Xiang et al., 2011), and has been recently showed that also attenuate expression of c-MYC and NOTCH1 (Chen et al., 2012b), constituting another positive loop for maintaining the self-renewal. In addition, c-MYC potentiates SOX2 expression, providing yet another feed forward loop to sustain self-renewal, being implicated diverse miRNA that are modulated by these transcription factors (Gunaratne, 2009; Li, 2010; Marson et al., 2008).

Therefore, tumour-adjacent fat and stroma are rich in factors which are involved in CSC biology, and these results confirm the essential role of the niche to support tumour growth and aggressiveness in breast cancer. Present findings may also have relevance to colon and ovarian cancers, since both directly invade mesenteric fat, and to the tropism of many cancers to bone marrow, another highly fatty environment.

In regard to pro-angiogenic factors, it is well known that VEGF plays a key role in tumour angiogenesis that is necessary for tumour progression (George et al., 2011). VEGF secreted by cancer cells and stroma, binds receptors on endothelial cells to stimulate new blood vessels needed to support cancer growth and metastasis (Chung et al., 2010a). In addition to angiogenesis, VEGF is a mitogen in many normal tissues, mainly for endothelial cells, and also shows multiple additional functions, including normal maintenance of endothelial and neural cell compartments (Senger, 2010). Moreover, VEGF can also promote autocrine growth factor-mediated tumor cell proliferation (Lichtenberger et al., 2010). In this sense, VEGF may participate in the acquisition of stem cell-like properties by cancer cells. In order to elucidate the role of VEGF in CSC biology, we performed a series of experiments *in vitro* with the human breast cancer cell line MDA-MB-231 and also *in vivo* with the human breast cancer cells L2G.

As occurred with previously studied cytokines, VEGF in MDA-MB-231 did not affect the proliferative capacity of cells, however, it produced a significant enrichment of the more tumorigenic CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation. Furthermore, VEGF increased the ability to form colonies in soft agar and mammospheres in suspension cultures, two hallmarks of BCSC (Hwang-Verslues et al., 2009). In addition, VEGF pre-treatment accelerated orthotopic tumour development *in vivo*, that was not attributed to direct angiogenic effects. These data suggest that VEGF not only creates a perivascular niche for CSC, but also is involved in the acquisition of stem cell-like characteristics and promotes CSC symmetrical division. In this sense, VEGF was recently reported to stimulate squamous cell skin carcinoma CSC, suggesting that VEGF may promote their expansion (Beck et al., 2011) as has been shown in glioma (Calabrese et al., 2007; Hamerlik et al., 2012) and melanoma (Frank et al., 2011).

These data reveal a novel role for VEGF to stimulate CSC independent of direct mitogenic or pro-angiogenic effects. In addition, our results show evidence for the possible benefits of drugs targeting VEGF to reduce both angiogenesis and CSC growth.

Effect of Paclitaxel and GSI in BCSC subpopulations

Regarding to the therapeutic implications of CSC, it has been demonstrated that functional differences between tumorigenic and non-tumorigenic cells influence response to therapy and prognosis (Magee et al., 2012). These findings and the advances in CSC biology have led to the study of new therapies directed against CSC. One approach consists in the inhibition of specific cell signaling pathways that are deregulated in CSC (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011). Here, we have studied the effect of conventional and CSC-target therapies. For this purpose, MDA-MB-231 cells were treated with Paclitaxel or DAPT, in order to determine which subpopulations, CD44⁺/CD24^{low+} or CD44⁺/CD24^{neg}, were more sensitive to each therapy.

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent widely clinically used for the treatment of different cancer types, including breast cancer. When MDA-MB-231 cells were treated with this drug, it was produced a detention in G2/M phase. However, CD44⁺/CD24^{low+} cells continued replicating their DNA, generating cells with a 8n nuclear DNA content. In addition, the proportion of CD44⁺/CD24^{low+} increased in the cultures overtime, and

even the number of these cells increased at the beginning of the treatment, indicating that CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation was more resistant than CD44⁺/CD24^{neg} to Paclitaxel treatment. The effect observed in cell cycle profile was expected, since this drug act which acts stabilizing microtubules during mitosis, inducing cell death mediated by mitotic catastrophe (Yue et al., 2010). Moreover, the higher cell resistance showed by the more tumorigenic CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation may reflect that these cells posses increased mechanism to eliminate this and other drugs, and which are elevated in cancer cells with stem cell-like properties, such as high expression levels of free radical scavengers, activation of cell cyle checkpoints, dysregulation of apoptotic pathways, over-expression of MDR proteins and detoxification enzymes or quiescence (Bao et al., 2006; Bartucci et al., 2012; Brunner et al., 2012; Croker and Allan, 2012; Lagadec et al., 2012; Li and Bhatia, 2011; Todaro et al., 2007).

On the other hand, therapeutic strategies target to inhibit γ -secretase activity constitute a new approach against CSC. These enzymes are responsible for the proteolytic cleavage of the intracellular membrane domain of NOTCH receptor, releasing the active NICD into the cytoplasm, producing an activation of Notch pathway (Hu and Fu, 2012; Takebe et al., 2011). MDA-MB-231 cells treated with DAPT, a GSI, down-regulated both NICD and SOX2 levels. In this sense, it has been observed that over-expression of cleaved NOTCH1 and Notch activation mediate self-renewal in ER⁻ breast cancers by activating SOX2 expression, a transcription factor involved in pluripotency (Ince et al., 2007; Visvader, 2011). However, when both subpopulations were studied separately, we observed that only CD44⁺/CD24^{low+} was affected, showing a decrease in their proportion and a change in their cell cycle profile. These results suggest that Notch pathway activation is restricted to CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation, playing an important role in tumorigenic events and in BCSC targeted therapies.

In conclusion, our results indicate that both BCSC subpopulations, identified in the MDA-MB-231 breast cancer cell line, differ notably in their response to Paclitaxel and DAPT treatment. In this sense, the use of GSI is a better targeting therapy against BCSC, since CD44⁺/CD24^{low+} cells have been proved that posses more stem cell-like features and were sensitive to DAPT.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Our results indicate that subcutaneous adipose tissue may be a useful source of autologous ME-LC with the capacity to maintain their vascular progenitor properties.
2. The culture method described in the present study may be used to isolate, maintain, and propagate these cells with an increased expression of specific endothelial progenitor markers. The collection of a high rate of progenitor cells can overcome the limited proliferation potential of mature EC and EPC, which hampers their clinical use.
3. Isolated ME-LC increased the secretion of SDF-1, formed vascular-like structures, and displayed the ability to migrate toward a cytokine gradient.
4. Isolated ME-LC retained the capacity to differentiate into cardiomyocyte-like cells, showing expression of typical cardiomyocyte markers. This property suggests the potential of ME-LC to recellularize damaged tissue or strengthen the post-infarct scar as well as inducing neovascularization of the affected area, which could have advantages in the stem cell-based cardiovascular therapy.
5. The extensive evaluation of different methodologies developed to isolate and to characterize CSC in human cancer cell line models allowed the selection of CSC subpopulations with high tumour markers expression, increased self-renewal, colonogenicity ability, and enhanced *in vivo* tumorigenic potential.
6. We isolated two subpopulations with CSC characteristics from the human MDA-MB-231 breast cancer cell line. CD44⁺/CD24^{low+} cells had the capacity to self-renew and give rise to CD44⁺/CD24^{neg} subpopulation, while the CD44⁺/CD24^{neg} cells remained phenotypically homogeneous. This reestablishment of tumour heterogeneity is indicative of a greater tumorigenic potential for the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation.

7. We isolated a subpopulation of trypsin-sensitive cells from the T-84 and HT-29 human colon cancer cell lines, and the MCF-7 human breast cancer cell line with CSC characteristics. T-84 trypsin-sensitive cells showed a high tumorigenic potential in mouse xenograft models and had the capacity to form tumours that recapitulate the original population.

8. Pro-inflammatory and pro-angiogenic factors produced in tumours including different cytokines such as CCL2, CCL5, IP-10, IL-6, IL-8 and VEGF, induced enrichment in cancer cells with stem cell-like properties in the MDA-MB-231 cell line and were also involved in the aggressiveness of the tumour cells.

9. Paclitaxel displayed a low effectiveness in the BCSC subpopulation with higher stemness characteristics. CD44⁺/CD24^{low+} cells were more resistant to Paclitaxel treatment than CD44⁺/CD24^{neg}, suggesting that this therapy is not selective for CSC.

10. The targeted antitumor activity by DAPT γ -secretase inhibitor against Notch pathway was confirmed in these resistant BCSC. Interestingly, DAPT treatment had no effect in CD44⁺/CD24^{neg} cells, suggesting that Notch activation is restricted to the CD44⁺/CD24^{low+} subpopulation.

BIBLIOGRAPHY

-
- Aalaoui-Jamali, M., Bijian, K. and Batist, G., 2011. Emerging drug discovery approaches for selective targeting of "precursor" metastatic breast cancer cells: highlights and perspectives. *Am J Transl Res*, 3(5): 434-44.
- Abbott, J.D. et al., 2004. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 110(21): 3300-5.
- Adams, J.M. and Cory, S., 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9): 1324-37.
- Aharinejad, S., Sioud, M., Lucas, T. and Abraham, D., 2009. Targeting stromal-cancer cell interactions with siRNAs. *Methods Mol Biol*, 487: 243-66.
- Ahrens, I. et al., 2011. Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression. *PLoS One*, 6(8): e23210.
- Aicher, A. et al., 2007. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res*, 100(4): 581-9.
- Al-Ejeh, F. et al., 2011. Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. *Carcinogenesis*, 32(5): 650-8.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. and Clarke, M.F., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7): 3983-8.
- Al-Nbaheen, M. et al., 2012. Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. *Stem Cell Rev*.
- Al Battah, F., De Kock, J., Vanhaecke, T. and Rogiers, V., 2011. Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *ScientificWorldJournal*, 11: 1568-81.
- Almeida-Porada, G., El Shabrawy, D., Porada, C. and Zanjani, E.D., 2002. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*, 30(12): 1454-62.
- Alt, E.U. et al., 2012. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res*, 8(2): 215-25.

-
- Allen, P., Melero-Martin, J. and Bischoff, J., 2011. Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks. *J Tissue Eng Regen Med*, 5(4): e74-86.
- Anguita Sanchez, M. et al., 2008. Prevalence of heart failure in the Spanish general population aged over 45 years. The PRICE Study. *Rev Esp Cardiol*, 61(10): 1041-9.
- Antonitsis, P. et al., 2008. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Thorac Cardiovasc Surg*, 56(2): 77-82.
- Ao, M. et al., 2011. Lubiprostone activates Cl⁻ secretion via cAMP signaling and increases membrane CFTR in the human colon carcinoma cell line, T84. *Dig Dis Sci*, 56(2): 339-51.
- Arminan, A. et al., 2010. Cardiac transcription factors driven lineage-specification of adult stem cells. *J Cardiovasc Transl Res*, 3(1): 61-5.
- Asahara, T., Kawamoto, A. and Masuda, H., 2011. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*, 29(11): 1650-5.
- Asahara, T. et al., 1999a. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85(3): 221-8.
- Asahara, T. et al., 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302): 964-7.
- Asahara, T. et al., 1999b. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18(14): 3964-72.
- Asaka, S. et al., 2009. Microsatellite instability-low colorectal cancer acquires a KRAS mutation during the progression from Dukes' A to Dukes' B. *Carcinogenesis*, 30(3): 494-9.
- Atala, A., 2012. Regenerative medicine strategies. *J Pediatr Surg*, 47(1): 17-28.
- Athanassiadou, P. et al., 2009. CD24 expression has a prognostic impact in breast carcinoma. *Pathol Res Pract*, 205(8): 524-33.
- Baba, A.I. and Cătoiu, C., 2007. Comparative oncology. The Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest, 787 p., 120 p. of plates pp.

-
- Bacenkova, D., Rosocha, J., Tothova, T., Rosocha, L. and Sarissky, M., 2011. Isolation and basic characterization of human term amnion and chorion mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 13(9): 1047-56.
- Bae, K.S. et al., 2011. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J*, 52(3): 401-12.
- Bagley, R.G., Weber, W., Rouleau, C. and Teicher, B.A., 2005. Pericytes and endothelial precursor cells: cellular interactions and contributions to malignancy. *Cancer Res*, 65(21): 9741-50.
- Bagnoli, M., Canevari, S. and Mezzanzanica, D., 2010. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(2): 210-3.
- Bai, J. et al., 2012. Human amniotic fluid-derived c-kit(+) and c-kit (-) stem cells: growth characteristics and some differentiation potential capacities comparison. *Cytotechnology*.
- Bakogiannis, C. et al., 2012. Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes. *Curr Med Chem*, 19(16): 2597-604.
- Balana, B. et al., 2006. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res*, 16(12): 949-60.
- Balbarini, A., Barsotti, M.C., Di Stefano, R., Leone, A. and Santoni, T., 2007. Circulating endothelial progenitor cells characterization, function and relationship with cardiovascular risk factors. *Curr Pharm Des*, 13(16): 1699-713.
- Ball, S.G., Shuttleworth, C.A. and Kielty, C.M., 2007. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Mol Med*, 11(5): 1012-30.
- Banas, A. et al., 2009. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, 24(1): 70-7.
- Banegas, J.R., Rodríguez-Atalejo, F. and Guallar-Castillón, P., 2006. Situación epidemiológica de la insuficiencia cardíaca en España. *Rev Esp Cardiol*, 6(Supl. C): 4-9.
- Bao, S. et al., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120): 756-60.

-
- Barker, N. et al., 2009. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, 457(7229): 608-11.
- Barrero, M.J. and Izpisua Belmonte, J.C., 2011. Regenerating the epigenome. *EMBO Rep*, 12(3): 208-15.
- Barry, F.P. and Murphy, J.M., 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(4): 568-84.
- Bartucci, M. et al., 2012. Therapeutic targeting of Chk1 in NSCLC stem cells during chemotherapy. *Cell Death Differ*, 19(5): 768-78.
- Bartunek, J. et al., 2005. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation*, 112(9 Suppl): I178-83.
- Bassi, E.J., Aita, C.A. and Camara, N.O., 2011. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*, 3(1): 1-8.
- Bautch, V.L., 2011. Stem cells and the vasculature. *Nat Med*, 17(11): 1437-43.
- Baylin, S.B. and Jones, P.A., 2011. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*, 11(10): 726-34.
- Beck, B. et al., 2011. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature*, 478(7369): 399-403.
- Becker, A.J., McCulloch, E.A. and Till, J.E., 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197: 452-4.
- Behr, B., Ko, S.H., Wong, V.W., Gurtner, G.C. and Longaker, M.T., 2010. Stem cells. *Plast Reconstr Surg*, 126(4): 1163-71.
- Belema-Bedada, F., Uchida, S., Martire, A., Kostin, S. and Braun, T., 2008. Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell*, 2(6): 566-75.
- Beltrami, A.P. et al., 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114(6): 763-76.
- Bell, E., Ehrlich, H.P., Buttle, D.J. and Nakatsuji, T., 1981. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 211(4486): 1052-4.

-
- Ben-David, U. and Benvenisty, N., 2011. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*, 11(4): 268-77.
- Bendre, M.S. et al., 2002. Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo. *Cancer Res*, 62(19): 5571-9.
- Benetti, F. et al., 2010. Direct myocardial implantation of human fetal stem cells in heart failure patients: long-term results. *Heart Surg Forum*, 13(1): E31-5.
- Benoy, I.H. et al., 2004. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*, 10(21): 7157-62.
- Bhartiya, D., 2012. Pluripotent VSEs Get Discarded during Cord Blood & Bone Marrow Processing. *Stem Cells Dev*.
- Bhattacharyya, S. and Khanduja, K.L., 2010. New hope in the horizon: cancer stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42(4): 237-42.
- Bieback, K. and Brinkmann, I., 2010. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*, 2(4): 81-92.
- Bieback, K., Kern, S., Kluter, H. and Eichler, H., 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22(4): 625-34.
- Bircan, S., Kapucuoglu, N., Baspinar, S., Inan, G. and Candir, O., 2006. CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol Res Pract*, 202(8): 569-76.
- Bisceglie, V., 1933. Über die antineoplastische Immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-embryonen. *Ztschr Krebsforsch*, 40: 122-140.
- Bizzetto, R. et al., 2011. Outcomes after related and unrelated umbilical cord blood transplantation for hereditary bone marrow failure syndromes other than Fanconi anemia. *Haematologica*, 96(1): 134-41.
- Boland, M.J. et al., 2009. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*, 461(7260): 91-4.
- Bolli, R. et al., 2011. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*, 378(9806): 1847-57.

- Bosman, F.T., World Health Organization. and International Agency for Research on Cancer., 2010. WHO classification of tumours of the digestive system. World Health Organization classification of tumours. IARC Press, Lyon, 417 pp.
- Boveri, T., 1892. Über die Entstehung des Gegensatzes zwischen Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei *Ascaris megalocephala*. *Morph Physiol*, 8: 114-125.
- Boyle, P. and Levin, B., 2008. World cancer report 2008. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer; Lyon 510 pp.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Brazzini, A. et al., 2010. Intraarterial autologous implantation of adult stem cells for patients with Parkinson disease. *J Vasc Interv Radiol*, 21(4): 443-51.
- Britton, K.M. et al., 2012. Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression. *Cancer Lett*, 323(1): 97-105.
- Broadley, K.W. et al., 2011. Side population is not necessary or sufficient for a cancer stem cell phenotype in glioblastoma multiforme. *Stem Cells*, 29(3): 452-61.
- Bromberg, J. and Wang, T.C., 2009. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell*, 15(2): 79-80.
- Brower, V., 2011. Epigenetics: Unravelling the cancer code. *Nature*, 471(7339): S12-3.
- Brunner, T.B., Kunz-Schughart, L.A., Grosse-Gehling, P. and Baumann, M., 2012. Cancer stem cells as a predictive factor in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*, 22(2): 151-74.
- Brunt, K.R., Weisel, R.D. and Li, R.K., 2012. Stem cells and regenerative medicine - future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol*, 90(3): 327-35.
- Burke, J.F., Yannas, I.V., Quinby, W.C., Jr., Bondoc, C.C. and Jung, W.K., 1981. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, 194(4): 413-28.
- Burkhart, D.L. and Sage, J., 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 8(9): 671-82.
- Bystron, M. et al., 2010. Randomized comparison of endothelial progenitor cells capture stent versus cobalt-chromium stent for treatment of ST-elevation myocardial infarction. Six-

- month clinical, angiographic, and IVUS follow-up. *Catheter Cardiovasc Interv*, 76(5): 627-31.
- Cabodi, S. and Taverna, D., 2010. Interfering with inflammation: a new strategy to block breast cancer self-renewal and progression? *Breast Cancer Res*, 12(2): 305.
- Caiado, F. et al., 2011. The role of fibrin E on the modulation of endothelial progenitors adhesion, differentiation and angiogenic growth factor production and the promotion of wound healing. *Biomaterials*, 32(29): 7096-105.
- Calabrese, C. et al., 2007. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 11(1): 69-82.
- Campagnoli, C. et al., 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8): 2396-402.
- Campbell, M.J. et al., 2011. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat*, 128(3): 703-11.
- Campioni, D., Lanza, F., Moretti, S., Ferrari, L. and Cuneo, A., 2008. Loss of Thy-1 (CD90) antigen expression on mesenchymal stromal cells from hematologic malignancies is induced by in vitro angiogenic stimuli and is associated with peculiar functional and phenotypic characteristics. *Cytotherapy*, 10(1): 69-82.
- Cao, F. et al., 2004. Cardiomyocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells after exposure of 5-azacytidine in vitro. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 37(2): 118-24.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5): 641-50.
- Caplan, A.I., 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*, 217(2): 318-24.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347): 298-307.
- Carmichael, A.R., 2006. Obesity as a risk factor for development and poor prognosis of breast cancer. *BJOG*, 113(10): 1160-6.
- Carrasco, E. et al., 2006. Manejo de las vasculopatías periféricas en atención primaria. EdikaMed, Barcelona, 96 pp.

-
- Catalano, V. et al., 2011. Colorectal Cancer Stem Cells and Cell Death. *Cancers*, 3(2): 1929-1946.
- Ceradini, D.J. et al., 2008. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem*, 283(16): 10930-8.
- Clay, M.R. et al., 2010. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*, 32(9): 1195-201.
- Cogliano, V.J. et al., 2011. Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 103(24): 1827-39.
- Cohnheim, J., 1867. Über entzündung und Eiterung. *Arch Path Anat Physiol Klin Med* 40: 1-79.
- Colazzo, F., Chester, A.H., Taylor, P.M. and Yacoub, M.H., 2010. Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells. *J Heart Valve Dis*, 19(6): 736-44.
- Colgan, S.P., Eltzschig, H.K., Eckle, T. and Thompson, L.F., 2006. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*, 2(2): 351-60.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. and Mantovani, A., 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7): 1073-81.
- Comsa, S., Ciuculescu, F. and Raica, M., 2012. Mesenchymal stem cell-tumor cell cooperation in breast cancer vasculogenesis. *Mol Med Report*, 5(5): 1175-80.
- Connick, P. et al., 2012. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol*, 11(2): 150-6.
- Constantinescu, D., Gray, H.L., Sammak, P.J., Schatten, G.P. and Csoka, A.B., 2006. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*, 24(1): 177-85.
- Corcione, A. et al., 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107(1): 367-72.
- Corselli, M., Chen, C.W., Crisan, M., Lazzari, L. and Peault, B., 2010. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(6): 1104-9.

-
- Corselli, M. et al., 2012. The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 21(8): 1299-308.
- Cotter, T.G., 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, 9(7): 501-7.
- Covas, D.T. et al., 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*, 36(5): 642-54.
- Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A. and Eggan, K., 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309(5739): 1369-73.
- Crisan, M. et al., 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3): 301-13.
- Critser, P.J., Kreger, S.T., Voytik-Harbin, S.L. and Yoder, M.C., 2010. Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo. *Microvasc Res*, 80(1): 23-30.
- Crocker, A.K. and Allan, A.L., 2012. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44(+) human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 133(1): 75-87.
- Crocker, A.K. et al., 2009. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*, 13(8B): 2236-52.
- Cuellar-Rodriguez, J. et al., 2011. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. *Blood*, 118(13): 3715-20.
- Culme-Seymour, E.J. and Mason, C., 2012. Cell therapy and regenerative medicine glossary. *Regen Med*, 7(3 Suppl): S1-S124.
- Chanda, D., Kumar, S. and Ponnazhagan, S., 2010. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *J Cell Biochem*, 111(2): 249-57.
- Charafe-Jauffret, E. et al., 2009. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res*, 69(4): 1302-13.

-
- Chavey, C. et al., 2007. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res*, 9(1): R15.
- Chen, L. et al., 2012a. A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 7(4): e33544.
- Chen, L., Wang, D., Wu, Z., Ma, L. and Daley, G.Q., 2010. Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res*, 20(9): 982-93.
- Chen, S. et al., 2012b. SOX2 gene regulates the transcriptional network of oncogenes and affects tumorigenesis of human lung cancer cells. *PLoS One*, 7(5): e36326.
- Chen, W.L. and Simmons, C.A., 2011. Lessons from (patho)physiological tissue stiffness and their implications for drug screening, drug delivery and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(4-5): 269-76.
- Cheng, L. et al., 2011. The clinical and therapeutic implications of cancer stem cell biology. *Expert Rev Anticancer Ther*, 11(7): 1131-43.
- Cheng, M.T., Yang, H.W., Chen, T.H. and Lee, O.K., 2009. Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments. *Cell Prolif*, 42(4): 448-60.
- Chiao, E., Kmet, M., Behr, B. and Baker, J., 2008. Derivation of human embryonic stem cells in standard and chemically defined conditions. *Methods Cell Biol*, 86: 1-14.
- Chikamatsu, K., Takahashi, G., Sakakura, K., Ferrone, S. and Masuyama, K., 2011. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 33(2): 208-15.
- Chiou, M., Xu, Y. and Longaker, M.T., 2006. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 343(2): 644-52.
- Cho, S.W. et al., 2012. Therapeutic angiogenesis using genetically engineered human endothelial cells. *J Control Release*.
- Cho, W.C., 2012. MicroRNAs as therapeutic targets and their potential applications in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*.
- Choi, K.D. et al., 2012. Identification of the hemogenic endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep*, 2(3): 553-67.

-
- Christgen, M., Ballmaier, M., Lehmann, U. and Kreipe, H., 2012. Detection of putative cancer stem cells of the side population phenotype in human tumor cell cultures. *Methods Mol Biol*, 878: 201-15.
- Chung, A.S., Lee, J. and Ferrara, N., 2010a. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 10(7): 505-14.
- Chung, D.C., Haber, D.A. and Massachusetts General Hospital., 2010b. Principles of clinical cancer genetics: a handbook from the Massachusetts General Hospital. Springer, New York, xi, 227 pp.
- Chung, Y. et al., 2008. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*, 2(2): 113-7.
- D'Ippolito, G. et al., 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci*, 117(Pt 14): 2971-81.
- da Silva Meirelles, L., Caplan, A.I. and Nardi, N.B., 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26(9): 2287-99.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C. and Nardi, N.B., 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119(Pt 11): 2204-13.
- Dalerba, P. et al., 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24): 10158-63.
- Dantschakoff, W., 1908. Untersuchungen über die Entwicklung des Blutes und Bindegewebes bei den Vögeln. *Anat Hefte*, 37: 471-589.
- Davatchi, F., Abdollahi, B.S., Mohyeddin, M., Shahram, F. and Nikbin, B., 2011. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis*, 14(2): 211-5.
- Davies, N.J., Batehup, L. and Thomas, R., 2011. The role of diet and physical activity in breast, colorectal, and prostate cancer survivorship: a review of the literature. *Br J Cancer*, 105 Suppl 1: S52-73.
- De Francesco, F. et al., 2009. Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One*, 4(8): e6537.

-
- De Larco, J.E., Wuertz, B.R., Manivel, J.C. and Furcht, L.T., 2001. Progression and enhancement of metastatic potential after exposure of tumor cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, 61(7): 2857-61.
- de Martel, C. et al., 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*, 13(6): 607-15.
- De Miguel, M.P. et al., 2012. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*.
- De Toni, F. et al., 2011. Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies. *Stem Cells Dev*, 20(12): 2127-38.
- Degirolamo, C., Modica, S., Palasciano, G. and Moschetta, A., 2011. Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. *Trends Mol Med*, 17(10): 564-72.
- Demirbag, B., Huri, P.Y., Kose, G.T., Buyuksungur, A. and Hasirci, V., 2011. Advanced cell therapies with and without scaffolds. *Biotechnol J*, 6(12): 1437-53.
- den Dekker, W.K. et al., 2011. Final results of the HEALING IIB trial to evaluate a bio-engineered CD34 antibody coated stent (GenousStent) designed to promote vascular healing by capture of circulating endothelial progenitor cells in CAD patients. *Atherosclerosis*, 219(1): 245-52.
- Deng, D., Liu, Z. and Du, Y., 2010. Epigenetic alterations as cancer diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers. *Adv Genet*, 71: 125-76.
- Deonarain, M.P., Kousparou, C.A. and Epenetos, A.A., 2009. Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy? *MAbs*, 1(1): 12-25.
- Dey, D. et al., 2009. Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture. *PLoS One*, 4(4): e5329.
- Di Stefano, R. et al., 2008. The prostacyclin analogue iloprost increases circulating endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia. *Thromb Haemost*, 100(5): 871-7.
- Dick, J.E., 2009. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol*, 27(1): 44-6.
- Diez-Tejedor, E., del Brutto, O., Alvarez Sabin, J., Munoz, M. and Abiusi, G., 2001. Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society. *Rev Neurol*, 33(5): 455-64.

-
- Diez, M., Musri, M.M., Ferrer, E., Barbera, J.A. and Peinado, V.I., 2010. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc Res*, 88(3): 502-11.
- Dimmeler, S. et al., 2001. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 108(3): 391-7.
- Diotti, R. and Loayza, D., 2011. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*, 2(2): 119-35.
- Dirat, B. et al., 2011. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*, 71(7): 2455-65.
- Dominici, M. et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-7.
- Dong, J.Y. and Qin, L.Q., 2011. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*, 125(2): 315-23.
- Dong, L.M. et al., 2008. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA*, 299(20): 2423-36.
- Dragoo, J.L. et al., 2003. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res*, 21(4): 622-9.
- Dreesen, O. and Brivanlou, A.H., 2007. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*, 3(1): 7-17.
- Durrett, R., Foo, J., Leder, K., Mayberry, J. and Michor, F., 2011. Intratumor heterogeneity in evolutionary models of tumor progression. *Genetics*, 188(2): 461-77.
- Dvorak, P. et al., 2005. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23(8): 1200-11.
- Ebben, J.D., Zorniak, M., Clark, P.A. and Kuo, J.S., 2011. Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine. *World Neurosurg*, 76(3-4): 270-5.
- Economopoulou, P., Kaklamani, V.G. and Siziopikou, K., 2012. The Role of Cancer Stem Cells in Breast Cancer Initiation and Progression: Potential Cancer Stem Cell-Directed Therapies. *Oncologist*.

-
- Edwards, R.G., Bavister, B.D. and Steptoe, P.C., 1969. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*, 221(5181): 632-5.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S. and Werb, Z., 2010. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*, 18(6): 884-901.
- Egorova, A.D. et al., 2012. Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 48(1): 21-9.
- Elsaba, T.M. et al., 2010. The stem cell marker CD133 associates with enhanced colony formation and cell motility in colorectal cancer. *PLoS One*, 5(5): e10714.
- Engelmann, M.G. et al., 2006. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol*, 48(8): 1712-21.
- Eschenhagen, T., Eder, A., Vollert, I. and Hansen, A., 2012. Physiological Aspects of Cardiac Tissue engineering. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819): 154-6.
- Fadini, G.P., Losordo, D. and Dimmeler, S., 2012. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*, 110(4): 624-37.
- Fadini, G.P. et al., 2006. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem Cells*, 24(7): 1806-13.
- Fanale, D. et al., 2012. Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene*, 31(17): 2121-8.
- Fang, D.D. et al., 2010. Expansion of CD133(+) colon cancer cultures retaining stem cell properties to enable cancer stem cell target discovery. *Br J Cancer*, 102(8): 1265-75.
- Farrington-Rock, C. et al., 2004. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*, 110(15): 2226-32.
- Feng, G., Wan, Y., Balian, G., Laurencin, C.T. and Li, X., 2008. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells. *Growth Factors*, 26(3): 132-42.

-
- Ferlay, J. et al., 2008. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet], Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 27 June 2012.
- Ferrara, N., 2010. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(1): 21-6.
- Fillmore, C.M. and Kuperwasser, C., 2008. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*, 10(2): R25.
- Flores-Ramirez, R. et al., 2010. Intracoronary infusion of CD133+ endothelial progenitor cells improves heart function and quality of life in patients with chronic post-infarct heart insufficiency. *Cardiovasc Revasc Med*, 11(2): 72-8.
- Florian, M.C. and Geiger, H., 2010. Concise review: polarity in stem cells, disease, and aging. *Stem Cells*, 28(9): 1623-9.
- Fontana, L., Eagon, J.C., Trujillo, M.E., Scherer, P.E. and Klein, S., 2007. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*, 56(4): 1010-3.
- Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W. and Loutit, J.F., 1956. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, 177(4506): 452-4.
- Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T. and Carmeliet, P., 2009. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell*, 16(2): 167-79.
- Frank, N.Y. et al., 2011. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. *Cancer Res*, 71(4): 1474-85.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F. and Kulagina, N.N., 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4(5): 267-74.
- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. and Frolova, G.P., 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2): 230-47.
- Fulda, S. and Vucic, D., 2012. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 11(2): 109-24.
- Furuhata, S. et al., 2007. Gene expression profiles of endothelial progenitor cells by oligonucleotide microarray analysis. *Mol Cell Biochem*, 298(1-2): 125-38.

-
- Galluzzi, L. et al., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19(1): 107-20.
- Gang, E.J. et al., 2006. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytherapy*, 8(3): 215-27.
- Gao, D. et al., 2008. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*, 319(5860): 195-8.
- Garcia-Olmo, D. et al., 2009. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum*, 52(1): 79-86.
- Gatti, L., Cossa, G., Beretta, G.L., Zaffaroni, N. and Perego, P., 2011. Novel insights into targeting ATP-binding cassette transporters for antitumor therapy. *Curr Med Chem*, 18(27): 4237-49.
- Gaustad, K.G., Boquest, A.C., Anderson, B.E., Gerdes, A.M. and Collas, P., 2004. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 314(2): 420-7.
- George, A.L. et al., 2011. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol*, 4: 24.
- Gerecht, S. et al., 2007. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(27): 11298-303.
- Ghaffari, S., 2011. Cancer, stem cells and cancer stem cells: old ideas, new developments. *F1000 Med Rep*, 3: 23.
- Ghorbanian, M.T., Haji Ghasem Kashani, M., Lashkarblouki, T., Hosseinpour, L. and Mirzaiyan, L., 2012. Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors. *Cell Biol Int*.
- Gil, J., Stembalska, A., Pesz, K.A. and Sasiadek, M.M., 2008. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet*, 49(2): 193-9.
- Gilbert, C.A. and Ross, A.H., 2009. Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem*, 108(5): 1031-8.
- Ginestier, C. et al., 2007. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5): 555-67.

-
- Giorgetti, A. et al., 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell*, 5(4): 353-7.
- Gnecchi, M., Danieli, P. and Cervio, E., 2012. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol*, 57(1): 48-55.
- Godier-Furnemont, A.F. et al., 2011. Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(19): 7974-9.
- Goel, A. and Boland, C.R., 2010. Recent insights into the pathogenesis of colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol*, 26(1): 47-52.
- Golocheikine, A. et al., 2010. Cooperative signaling for angiogenesis and neovascularization by VEGF and HGF following islet transplantation. *Transplantation*, 90(7): 725-31.
- Gomei, Y. et al., 2010. Functional differences between two Tie2 ligands, angiopoietin-1 and -2, in regulation of adult bone marrow hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 38(2): 82-9.
- Gong, D. et al., 2012. Prognostic relevance of circulating endothelial progenitor cells for severe traumatic brain injury. *Brain Inj*, 26(3): 291-7.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S. and Mulligan, R.C., 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 183(4): 1797-806.
- Gorbunova, V. and Seluanov, A., 2003. Telomerase as a growth-promoting factor. *Cell Cycle*, 2(6): 534-7.
- Greenwood, H.L. et al., 2006. Regenerative medicine and the developing world. *PLoS Med*, 3(9): e381.
- Griffiths, M.J., Bonnet, D. and Janes, S.M., 2005. Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet*, 366(9481): 249-60.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. and Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6): 883-99.
- Gunaratne, P.H., 2009. Embryonic stem cell microRNAs: defining factors in induced pluripotent (iPS) and cancer (CSC) stem cells? *Curr Stem Cell Res Ther*, 4(3): 168-77.
- Guo, S., Liu, M. and Gonzalez-Perez, R.R., 2011. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1815(2): 197-213.

-
- Gurdon, J.B., 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*, 10: 622-40.
- Guzik, T.J., Mangalat, D. and Korbut, R., 2006. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol*, 57(4): 505-28.
- Haeckel, E., 1868. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Reimier, Berlin.
- Haecker, V., 1892. Die Kerntheilungsvorgänge bei der Mesoderm- und Entodermbildung von Cyclops'. *Arch Mikrosk Anat*, 39: 556-581.
- Haghani, K., Bakhtiyari, S. and Nouri, A.M., 2012. In vitro study of the differentiation of bone marrow stromal cells into cardiomyocyte-like cells. *Mol Cell Biochem*, 361(1-2): 315-20.
- Hai, C. et al., 2012. Application of mesenchymal stem cells as a vehicle to deliver replication-competent adenovirus for treating malignant glioma. *Chin J Cancer*, 31(5): 233-40.
- Haibe-Kains, B. et al., 2012. A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst*, 104(4): 311-25.
- Halvorsen, Y.D. et al., 2001. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng*, 7(6): 729-41.
- Hall, P.A. and Watt, F.M., 1989. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, 106(4): 619-33.
- Hamerlik, P. et al., 2012. Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J Exp Med*, 209(3): 507-20.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-74.
- Hansen, L. et al., 2012. Intake of dietary fiber, especially from cereal foods, is associated with lower incidence of colon cancer in the HELGA cohort. *Int J Cancer*, 131(2): 469-78.
- Haraguchi, N. et al., 2006. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*, 24(3): 506-13.
- Harichandan, A. and Buhring, H.J., 2011. Prospective isolation of human MSC. *Best Pract Res Clin Haematol*, 24(1): 25-36.
- Harrington, L.S. et al., 2008. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res*, 75(2): 144-54.

-
- Harris, H., 1988. The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res*, 48(12): 3302-6.
- Harris, P.J., Speranza, G. and Dansky Ullmann, C., 2012. Targeting embryonic signaling pathways in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16(1): 131-45.
- Hass, R., Kasper, C., Bohm, S. and Jacobs, R., 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 9: 12.
- Heldin, C.H., 2012. Autocrine PDGF stimulation in malignancies. *Ups J Med Sci*, 117(2): 83-91.
- Hellberg, C., Ostman, A. and Heldin, C.H., 2010. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res*, 180: 103-14.
- Hellinger, M.D. and Santiago, C.A., 2006. Reoperation for recurrent colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg*, 19(4): 228-36.
- Herceg, Z. and Hainaut, P., 2007. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol*, 1(1): 26-41.
- Hermann, P.C., Bhaskar, S., Cioffi, M. and Heeschen, C., 2010. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol*, 20(2): 77-84.
- Hermann, P.C. et al., 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3): 313-23.
- Herschkowitz, J.I. et al., 2007. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 8(5): R76.
- Hirai, H., Samokhvalov, I.M., Fujimoto, T., Nishikawa, S. and Imanishi, J., 2005. Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells. *Blood*, 106(6): 1948-55.
- Hirashima, M. et al., 2003. A chemically defined culture of VEGFR2+ cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells. *Blood*, 101(6): 2261-7.
- Hirschi, K.K., Ingram, D.A. and Yoder, M.C., 2008. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(9): 1584-95.

-
- Hogan, B.M. et al., 2009. Vegfc/Flt4 signalling is suppressed by Dll4 in developing zebrafish intersegmental arteries. *Development*, 136(23): 4001-9.
- Hong, L. et al., 2007. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng*, 13(6): 1197-203.
- Horst, D. et al., 2009. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J Pathol*, 219(4): 427-34.
- Horwitz, E.M. et al., 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5): 393-5.
- Hostettler, L., Zlobec, I., Terracciano, L. and Lugli, A., 2010. ABCG5-positivity in tumor buds is an indicator of poor prognosis in node-negative colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*, 16(6): 732-9.
- Howson, K.M. et al., 2005. The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(6): C1396-407.
- Hu, Y. and Fu, L., 2012. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res*, 2(3): 340-56.
- Hu, Y. et al., 2003. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med*, 141(5): 342-9.
- Huang, C., Zhang, L., Wang, Z., Pan, H. and Zhu, J., 2011. Endothelial progenitor cells are associated with plasma homocysteine in coronary artery disease. *Acta Cardiol*, 66(6): 773-7.
- Huang, E.H. et al., 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*, 69(8): 3382-9.
- Huntly, B.J. and Gilliland, D.G., 2005. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer*, 5(4): 311-21.
- Hurt, E.M., Kawasaki, B.T., Klarmann, G.J., Thomas, S.B. and Farrar, W.L., 2008. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer*, 98(4): 756-65.

-
- Hwang-Verslues, W.W. et al., 2009. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One*, 4(12): e8377.
- IARC, 2012. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://monographs.iarc.fr>, accessed on 21 July 2012.
- Idowu, M.O. et al., 2012. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol*, 43(3): 364-73.
- Igreja, C. et al., 2008. Detailed molecular characterization of cord blood-derived endothelial progenitors. *Exp Hematol*, 36(2): 193-203.
- Ilic, D. and Polak, J.M., 2011. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Br Med Bull*, 98: 117-26.
- Imamura, H. et al., 2010. Transdifferentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into the smooth muscle cell lineage mediated by transforming growth factor-beta1. *Atherosclerosis*, 211(1): 114-21.
- in 't Anker, P.S. et al., 2003a. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*, 88(8): 845-52.
- In 't Anker, P.S. et al., 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 22(7): 1338-45.
- In 't Anker, P.S. et al., 2003b. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 102(4): 1548-9.
- Ince, T.A. et al., 2007. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell*, 12(2): 160-70.
- INE, 2012. Defunciones según la causa de muerte. Año 2010. Madrid, Spain: Instituto Nacional de Estadística. Available from: <http://www.ine.es>, accessed on 6 June 2012.
- Ingham, P.W. and McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 15(23): 3059-87.
- Ingram, D.A. et al., 2005. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*, 105(7): 2783-6.

-
- Inoue, K. et al., 2000. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 6(5): 2104-19.
- Itariu, B.K. et al., 2012. Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 96(5): 1137-49.
- Iwasaki, H. et al., 2006. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*, 113(10): 1311-25.
- Iwashima, S. et al., 2009. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev*, 18(4): 533-43.
- Jackson, W.M., Nesti, L.J. and Tuan, R.S., 2010. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. *Expert Opin Biol Ther*, 10(4): 505-17.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D. and Hemmati-Brivanlou, A., 2005. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 132(6): 1273-82.
- Jass, J.R., 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1): 113-30.
- Jazedje, T. et al., 2009. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. *J Transl Med*, 7: 46.
- Ji, H. et al., 2010. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature*, 467(7313): 338-42.
- Ji, J., Werbowetski-Ogilvie, T.E., Zhong, B., Hong, S.H. and Bhatia, M., 2009. Pluripotent transcription factors possess distinct roles in normal versus transformed human stem cells. *PLoS One*, 4(11): e8065.
- Jia, X. et al., 2011. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *J Mol Cell Biol*, 3(4): 230-8.
- Jiang, F. et al., 2009a. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*, 7(3): 330-8.
- Jiang, L., Li, J. and Song, L., 2009b. Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 41(7): 527-34.

-
- Jiang, R. et al., 2011. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. *Front Med*, 5(1): 94-100.
- Jiang, Y. et al., 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893): 41-9.
- Jin, G., Prabhakaran, M.P. and Ramakrishna, S., 2011. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomater*, 7(8): 3113-22.
- Jin, Z. and El-Deiry, W.S., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4(2): 139-63.
- Jones, D.L. and Wagers, A.J., 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1): 11-21.
- Joo, S., Ko, I.K., Atala, A., Yoo, J.J. and Lee, S.J., 2012. Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research. *Arch Pharm Res*, 35(2): 271-80.
- Jopling, C., Boue, S. and Izpisua Belmonte, J.C., 2011. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(2): 79-89.
- Joyce, J.A. and Pollard, J.W., 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9(4): 239-52.
- Kakudo, N., Shimotsuma, A. and Kusumoto, K., 2007. Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 359(2): 239-44.
- Kaneda, A. and Yagi, K., 2011. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci*, 102(1): 18-24.
- Kang, G.H., 2011. Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med*, 135(6): 698-703.
- Kang, H.J. et al., 2011. A multicenter, prospective, randomized, controlled trial evaluating the safety and efficacy of intracoronary cell infusion mobilized with granulocyte colony-stimulating factor and darbepoetin after acute myocardial infarction: study design and rationale of the 'MAGIC cell-5-combination cytokine trial'. *Trials*, 12(1): 33.
- Kanwar, S.S., Yu, Y., Nautiyal, J., Patel, B.B. and Majumdar, A.P., 2010. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer*, 9: 212.

-
- Karimi-Busheri, F., Zadorozhny, V., Carrier, E. and Fakhrai, H., 2012. Molecular integrity and global gene expression of breast and lung cancer stem cells under long-term storage and recovery. *Cell Tissue Bank*.
- Karnoub, A.E. et al., 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162): 557-63.
- Kasper, G. et al., 2007. Stromelysin-3 over-expression enhances tumourigenesis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines: involvement of the IGF-1 signalling pathway. *BMC Cancer*, 7: 12.
- Kawamoto, A. et al., 2009. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells*, 27(11): 2857-64.
- Kawamoto, A. and Losordo, D.W., 2008. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends Cardiovasc Med*, 18(1): 33-7.
- Keophiphath, M., Rouault, C., Divoux, A., Clement, K. and Lacasa, D., 2010. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(1): 39-45.
- Kessenbrock, K., Plaks, V. and Werb, Z., 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1): 52-67.
- Khan, N., Afaq, F. and Mukhtar, H., 2010. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett*, 293(2): 133-43.
- Kiessling, A.A. et al., 2009. Evidence that human blastomere cleavage is under unique cell cycle control. *J Assist Reprod Genet*, 26(4): 187-95.
- Kim, J. et al., 2012. Biologic and immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells derived from human pancreatic islets. *Cytherapy*.
- Kim, J.B. et al., 2009. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*, 461(7264): 649-3.
- Kim, S. and von Recum, H., 2008. Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application. *Tissue Eng Part B Rev*, 14(1): 133-47.

-
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B.T., Jacobsen, S.E. and Nerlov, C., 2006. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*, 7(10): 1048-56.
- Kirton, J.P., Wilkinson, F.L., Canfield, A.E. and Alexander, M.Y., 2006. Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification. *Circ Res*, 98(10): 1264-72.
- Kleinsmith, L.J. and Pierce, G.B., Jr., 1964. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res*, 24: 1544-51.
- Klemmt, P.A., Vafaizadeh, V. and Groner, B., 2011. The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*, 11(10): 1297-314.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.J. and Lanza, R., 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, 444(7118): 481-5.
- Knudson, A.G., Jr., 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4): 820-3.
- Kohn-Luque, A. et al., 2011. Early embryonic vascular patterning by matrix-mediated paracrine signalling: a mathematical model study. *PLoS One*, 6(9): e24175.
- Konig, J. et al., 2012. Amnion-derived mesenchymal stromal cells show angiogenic properties but resist differentiation into mature endothelial cells. *Stem Cells Dev*, 21(8): 1309-20.
- Koria, P., 2012. Delivery of growth factors for tissue regeneration and wound healing. *BioDrugs*, 26(3): 163-75.
- Koyanagi, M. et al., 2005. Differentiation of circulating endothelial progenitor cells to a cardiomyogenic phenotype depends on E-cadherin. *FEBS Lett*, 579(27): 6060-6.
- Kroemer, G. and Pouyssegur, J., 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13(6): 472-82.
- Kubinova, S. and Sykova, E., 2010. Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minim Invasive Ther Allied Technol*, 19(3): 144-56.
- Kucia, M. and Ratajczak, M.Z., 2006. Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 7: 5-16.

-
- Kucia, M. et al., 2006. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20(5): 857-69.
- Kuettner, H., 1912. Verimpfung an stelle der transplantation hochwertiger organe. *Zentralblatt für Chirurgie*, 1: 390-397.
- Kusumbe, A.P., Mali, A.M. and Bapat, S.A., 2009. CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells*, 27(3): 498-508.
- La Porta, C.A., 2012. Thoughts about cancer stem cells in solid tumors. *World J Stem Cells*, 4(3): 17-20.
- La Vignera, S., Condorelli, R.A., Vicari, E., D'Agata, R. and Calogero, A.E., 2011. New immunophenotype of blood endothelial progenitor cells and endothelial microparticles in patients with arterial erectile dysfunction and late-onset hypogonadism. *J Androl*, 32(5): 509-17.
- Labovsky, V. et al., 2010. Cardiomyogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal cells: Role of cardiac extract from neonatal rat cardiomyocytes. *Differentiation*, 79(2): 93-101.
- Lagadec, C., Dekmezian, C., Bauche, L. and Pajonk, F., 2012. Oxygen levels do not determine radiation survival of breast cancer stem cells. *PLoS One*, 7(3): e34545.
- Landa, N. et al., 2008. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulation*, 117(11): 1388-96.
- Landmesser, U. et al., 2005. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation*, 111(18): 2356-63.
- Langer, R., 2000. Tissue engineering. *Mol Ther*, 1(1): 12-5.
- Lapidot, T. et al., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464): 645-8.
- Lara-Hernandez, R. et al., 2010. Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia. *Ann Vasc Surg*, 24(2): 287-94.
- Lawlor, E.R. et al., 2006. Reversible kinetic analysis of Myc targets in vivo provides novel insights into Myc-mediated tumorigenesis. *Cancer Res*, 66(9): 4591-601.

-
- Le, X.F., Merchant, O., Bast, R.C. and Calin, G.A., 2010. The Roles of MicroRNAs in the Cancer Invasion-Metastasis Cascade. *Cancer Microenviron*, 3(1): 137-47.
- Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Gray, A., Petersen, S. and Rayner, M., 2006. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J*, 27(13): 1610-9.
- Leal, J.A. and Lleonaart, M.E., 2012. MicroRNAs and cancer stem cells: Therapeutic approaches and future perspectives. *Cancer Lett*.
- Lee, E.J. et al., 2012. New culture system for human embryonic stem cells: autologous mesenchymal stem cell feeder without exogenous fibroblast growth factor 2. *Differentiation*, 83(1): 92-100.
- Lee, H.J., Kim, D.I., Kwak, C., Ku, J.H. and Moon, K.C., 2008. Expression of CD24 in clear cell renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Urology*, 72(3): 603-7.
- Lee, S. et al., 2007. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, 130(4): 691-703.
- Lee, T.K. et al., 2011. CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell*, 9(1): 50-63.
- Legolvan, M.P., Taliano, R.J. and Resnick, M.B., 2012. Application of molecular techniques in the diagnosis, prognosis and management of patients with colorectal cancer: a practical approach. *Hum Pathol*, 43(8): 1157-68.
- Lehmann, B.D. et al., 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 121(7): 2750-67.
- Leistner, D.M. et al., 2011. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol*, 100(10): 925-34.
- Levine, B. and Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1): 27-42.
- Li, C. et al., 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67(3): 1030-7.
- Li, C., Lee, C.J. and Simeone, D.M., 2009. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol*, 568: 161-73.

-
- Li, C.J. et al., 2010. Effect of intracoronary infusion of bone marrow mononuclear cells or peripheral endothelial progenitor cells on myocardial ischemia-reperfusion injury in mini-swine. *Chin Med Sci J*, 25(3): 176-81.
- Li, L. and Bhatia, R., 2011. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res*, 17(15): 4936-41.
- Li, L. and Clevers, H., 2010. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, 327(5965): 542-5.
- Li, L. and Neaves, W.B., 2006. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*, 66(9): 4553-7.
- Li, Y.Q., 2010. Master stem cell transcription factors and signaling regulation. *Cell Reprogram*, 12(1): 3-13.
- Lian, I. et al., 2010. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*, 24(11): 1106-18.
- Lichtenauer, U.D. et al., 2008. Side population does not define stem cell-like cancer cells in the adrenocortical carcinoma cell line NCI h295R. *Endocrinology*, 149(3): 1314-22.
- Lichtenberger, B.M. et al., 2010. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell*, 140(2): 268-79.
- Lim, E. et al., 2009. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*, 15(8): 907-13.
- Lin, C.S., Ning, H., Lin, G. and Lue, T.F., 2012. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*, 14(10): 1159-63.
- Lipchina, I., Studer, L. and Betel, D., 2012. The expanding role of miR-302-367 in pluripotency and reprogramming. *Cell Cycle*, 11(8): 1517-23.
- Liu, H. et al., 2010a. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(42): 18115-20.
- Liu, W.H., Qian, N.S., Li, R. and Dou, K.F., 2010b. Replacing Hoechst33342 with rhodamine123 in isolation of cancer stem-like cells from the MHCC97 cell line. *Toxicol In Vitro*, 24(2): 538-45.
- Liu, Y. et al., 2006. A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(1): 131-9.

-
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D. and Clarke, M.F., 2007. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23: 675-99.
- Lohberger, B. et al., 2012. Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma. *PLoS One*, 7(8): e43664.
- Lopes, F.C. et al., 2009. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *BMC Complement Altern Med*, 9: 15.
- Lorenz, E. and Congdon, C.C., 1954. Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone. *J Natl Cancer Inst*, 14(4): 955-65.
- Lorico, A. and Rappa, G., 2011. Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells. *J Oncol*, 2011: 135039.
- Losordo, D.W. et al., 2011. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res*, 109(4): 428-36.
- Lozito, T.P., Kuo, C.K., Taboas, J.M. and Tuan, R.S., 2009. Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J Cell Biochem*, 107(4): 714-22.
- Lu, J., Hou, R., Booth, C.J., Yang, S.H. and Snyder, M., 2006. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(15): 5688-93.
- Luca, M. et al., 1997. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol*, 151(4): 1105-13.
- Ludwig, T.E. et al., 2006. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*, 24(2): 185-7.
- Luo, J., Solimini, N.L. and Elledge, S.J., 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136(5): 823-37.
- Ma, H.L., Hung, S.C., Lin, S.Y., Chen, Y.L. and Lo, W.H., 2003. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A*, 64(2): 273-81.
- Ma, I. and Allan, A.L., 2011. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev*, 7(2): 292-306.
- Magalhaes, B., Peleteiro, B. and Lunet, N., 2012. Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*, 21(1): 15-23.

-
- Magee, J.A., Piskounova, E. and Morrison, S.J., 2012. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, 21(3): 283-96.
- Maitland, N.J. and Collins, A.T., 2008. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol*, 26(17): 2862-70.
- Majed, B. et al., 2008. Is obesity an independent prognosis factor in woman breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*, 111(2): 329-42.
- Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoude, G.A. and Barrandon, Y., 2008. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, 456(7219): 250-4.
- Majore, I., Moretti, P., Stahl, F., Hass, R. and Kasper, C., 2011. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev*, 7(1): 17-31.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H. and Band, V., 2011. Shared signaling pathways in normal and breast cancer stem cells. *J Carcinog*, 10: 38.
- Mara, C.S. et al., 2011. Periosteum as a source of mesenchymal stem cells: the effects of TGF-beta3 on chondrogenesis. *Clinics (Sao Paulo)*, 66(3): 487-92.
- Mareschi, K. et al., 2006. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem*, 97(4): 744-54.
- Marhaba, R. and Zoller, M., 2004. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol*, 35(3): 211-31.
- Marson, A. et al., 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134(3): 521-33.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12): 7634-8.
- Martinez-Estrada, O.M., Munoz-Santos, Y., Julve, J., Reina, M. and Vilaro, S., 2005. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res*, 65(2): 328-33.
- Martinez, N.J. and Gregory, R.I., 2010. MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. *Cell Stem Cell*, 7(1): 31-5.

-
- Martinez, P. and Blasco, M.A., 2011. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*, 11(3): 161-76.
- Massa, M. et al., 2005. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*, 105(1): 199-206.
- Mathe, G. et al., 1959. Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation. *Rev Fr Etud Clin Biol*, 4(3): 226-38.
- Matoba, S. et al., 2008. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J*, 156(5): 1010-8.
- Maximow, A., 1908. Über embryonale Entwicklung der Blut - und Bindegewebszellen bei den Säugetieren. *Anat Anz*, 32: 65-72.
- Maxwell, K.N. and Domchek, S.M., 2012. Cancer treatment according to BRCA1 and BRCA2 mutations. *Nat Rev Clin Oncol*.
- McMurray, J.J. et al., 2012. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*.
- Medrano, M.J. et al., 2012. Towns with extremely low mortality due to ischemic heart disease in Spain. *BMC Public Health*, 12: 174.
- Melchor, L. and Benitez, J., 2008. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*, 29(8): 1475-82.
- Melero-Martin, J.M. et al., 2008. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res*, 103(2): 194-202.
- Meligy, F.Y. et al., 2012. The efficiency of in vitro isolation and myogenic differentiation of MSCs derived from adipose connective tissue, bone marrow, and skeletal muscle tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 48(4): 203-15.
- Mendez-Ferrer, S. et al., 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308): 829-34.
- Mendis, S., Puska, P. and Norrving, B., 2011. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization, Geneva, 155 pp.

-
- Menendez, P., Bueno, C. and Wang, L., 2006. Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies. *Cytotherapy*, 8(6): 530-41.
- Meng, E. et al., 2012. CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival. *Clin Exp Metastasis*.
- Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J. and Maley, C.C., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, 6(12): 924-35.
- Messenger, M.P. and Tomlins, P.E., 2011. Regenerative medicine: a snapshot of the current regulatory environment and standards. *Adv Mater*, 23(12): H10-7.
- Mezey, E., 2011. The therapeutic potential of bone marrow-derived stromal cells. *J Cell Biochem*, 112(10): 2683-7.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M. and Ford, H.L., 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2): 117-34.
- Mikryukov, A. and Moss, T., 2012. Agonistic and Antagonistic Roles for TNIK and MINK in Non-Canonical and Canonical Wnt Signalling. *PLoS One*, 7(9): e43330.
- Mimeault, M. and Batra, S.K., 2008. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev*, 4(1): 27-49.
- Mimeault, M., Hauke, R. and Batra, S.K., 2007. 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(3): 252-64.
- Min, T.Q., Zhu, C.J., Xiang, W.X., Hui, Z.J. and Peng, S.Y., 2004. Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther*, 18(3): 203-9.
- Minn, A.J. et al., 2005. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436(7050): 518-24.
- Mintz, B., 1964. Formation of Genetically Mosaic Mouse Embryos, and Early Development of "Lethal (T12/T12)-Normal" Mosaics. *J Exp Zool*, 157: 273-92.
- Mironov, V., Visconti, R.P. and Markwald, R.R., 2004. What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology. *Expert Opin Biol Ther*, 4(6): 773-81.

- Mirzaei, M. et al., 2012. Cerebrovascular disease in 48 countries: secular trends in mortality 1950-2005. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(2): 138-45.
- Mishra, P., Banerjee, D. and Ben-Baruch, A., 2011. Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *J Leukoc Biol*, 89(1): 31-9.
- Mitchell, J.B. et al., 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24(2): 376-85.
- Miyamoto, Y., Suyama, T., Yashita, T., Akimaru, H. and Kurata, H., 2007. Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells. *J Mol Cell Cardiol*, 43(5): 627-35.
- Mizuno, H., Tobita, M. and Uysal, A.C., 2012. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30(5): 804-10.
- Mohanty, S., Bose, S., Jain, K.G., Bhargava, B. and Airan, B., 2011. TGFbeta1 contributes to cardiomyogenic-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol*.
- Moore, K.A. and Lemischka, I.R., 2006. Stem cells and their niches. *Science*, 311(5769): 1880-5.
- Moreb, J.S. et al., 2012. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact*, 195(1): 52-60.
- Morrison, S.J. and Kimble, J., 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097): 1068-74.
- Morrison, S.J., Shah, N.M. and Anderson, D.J., 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88(3): 287-98.
- Mosterd, A. and Hoes, A.W., 2007. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 93(9): 1137-46.
- Munz, M., Baeuerle, P.A. and Gires, O., 2009. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res*, 69(14): 5627-9.
- Murasawa, S., Kawamoto, A., Horii, M., Nakamori, S. and Asahara, T., 2005. Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(7): 1388-94.

-
- Murphy, J.F., 2010. Trends in cancer immunotherapy. *Clin Med Insights Oncol*, 4: 67-80.
- Mustonen, T. and Alitalo, K., 1995. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol*, 129(4): 895-8.
- Myhre, B.A., 1990. The first recorded blood transfusions: 1656 to 1668. *Transfusion*, 30(4): 358-62.
- Nagoshi, N. et al., 2008. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*, 2(4): 392-403.
- Nagy, J.A. and Dvorak, H.F., 2012. Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin Exp Metastasis*.
- Nakagawa, M. et al., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 26(1): 101-6.
- Nakanishi, T. et al., 2010. Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling. *Br J Cancer*, 102(5): 815-26.
- Naugler, W.E. and Karin, M., 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med*, 14(3): 109-19.
- Nauta, A.J. and Fibbe, W.E., 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110(10): 3499-506.
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R. and Fibbe, W.E., 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177(4): 2080-7.
- Neef, K. et al., 2012. The influence of cardiovascular risk factors on bone marrow mesenchymal stromal cell fitness. *Cytotherapy*, 14(6): 670-8.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G. and Halazonetis, T.D., 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(3): 220-8.
- Neumann, E., 1868. Ueber die Bedeutung des Knochenmarkes für die Blutbildung, Vorläufige Mittheilung. *Zentralbl f d Mediz Wiss*, 44: 689.
- Neumann, E., 1912. Hämatologische Studien III, Leukozyten und Leukämie. *Arch f Mikrosk Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 207: 480-520.

- Neumuller, J. et al., 2006. Immunological and ultrastructural characterization of endothelial cell cultures differentiated from human cord blood derived endothelial progenitor cells. *Histochem Cell Biol*, 126(6): 649-64.
- Newsholme, E.A. and Leech, A.R., 2009. *Functional biochemistry in health and disease*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK ; Hoboken, N.J., xvi, 543 pp.
- Nicolini, A., Carpi, A. and Rossi, G., 2006. Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(5): 325-37.
- Nichols, J. and Smith, A., 2011. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development*, 138(1): 3-8.
- Niehans, P., 1960. *Introduction to cellular therapy*. Copper Square Pubs Inc, [S.I.].
- Nishida, S. et al., 2012. Gene expression profiles of prostate cancer stem cells isolated by aldehyde dehydrogenase activity assay. *J Urol*, 188(1): 294-9.
- Nowell, P.C., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260): 23-8.
- Numaguchi, Y. et al., 2006. The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation*, 114(1 Suppl): I114-9.
- O'Brien, C.A., Kreso, A. and Dick, J.E., 2009. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol*, 19(2): 71-7.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S. and Dick, J.E., 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123): 106-10.
- O'Brien, L.E., Soliman, S.S., Li, X. and Bilder, D., 2011. Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell*, 147(3): 603-14.
- Odorico, J.S., Kaufman, D.S. and Thomson, J.A., 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 19(3): 193-204.
- Oh, B.J. et al., 2010. Differences in donor CXCR4 expression levels are correlated with functional capacity and therapeutic outcome of angiogenic treatment with endothelial colony forming cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 398(4): 627-33.
- Ohmine, S. et al., 2012. Reprogrammed keratinocytes from elderly type 2 diabetes patients suppress senescence genes to acquire induced pluripotency. *Aging (Albany NY)*, 4(1): 60-73.

-
- Okamoto, O.K. and Perez, J.F., 2008. Targeting cancer stem cells with monoclonal antibodies: a new perspective in cancer therapy and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 8(4): 387-93.
- Oskowitz, A., McFerrin, H., Gutschow, M., Carter, M.L. and Pochampally, R., 2011. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Res*, 6(3): 215-25.
- Oswald, J. et al., 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 22(3): 377-84.
- Overdevest, J.B. et al., 2011. CD24 offers a therapeutic target for control of bladder cancer metastasis based on a requirement for lung colonization. *Cancer Res*, 71(11): 3802-11.
- Palomero, T. et al., 2006. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48): 18261-6.
- Pancione, M., Remo, A. and Colantuoni, V., 2012. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int*, 2012: 509348.
- Pang, R. et al., 2010. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*, 6(6): 603-15.
- Papayannopoulou, T., 2004. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 103(5): 1580-5.
- Pappenheim, A., 1896. Ueber Entwicklung und Ausbildung der Erythroblasten'. *Virchows Arch Pathol Anat*, 145: 587-643.
- Paprocka, M. et al., 2011. CD133 positive progenitor endothelial cell lines from human cord blood. *Cytometry A*, 79(8): 594-602.
- Pardee, A.B., Stein, G.S. and Wiley InterScience (Online service), 2009. The biology and treatment of cancer understanding cancer. Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J., ix, 287 pp.
- Park, I.H. et al., 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175): 141-6.
- Parsa, P. and Parsa, B., 2009. Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asian Pac J Cancer Prev*, 10(4): 545-50.

-
- Pasquet, S. et al., 2009. Long-term benefit of intracardiac delivery of autologous granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized blood CD34+ cells containing cardiac progenitors on regional heart structure and function after myocardial infarct. *Cytotherapy*, 11(8): 1002-15.
- Patra, S.K., Deb, M. and Patra, A., 2011. Molecular marks for epigenetic identification of developmental and cancer stem cells. *Clin Epigenetics*, 2(1): 27-53.
- Paul, G. et al., 2012. The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 7(4): e35577.
- Pawlik, A. et al., 2012. Hyperthermia induces cytoskeletal alterations and mitotic catastrophe in p53-deficient H1299 lung cancer cells. *Acta Histochem*.
- Pece, S. et al., 2010. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell*, 140(1): 62-73.
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A., 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7(6): 415-28.
- Peltomaki, P., 2012. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res*, 318(4): 299-310.
- Pelliccia, F. et al., 2010. Angiotensin II receptor antagonism with telmisartan increases number of endothelial progenitor cells in normotensive patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis*, 210(2): 510-5.
- Peran, M. et al., 2010. Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes. *Cytotherapy*, 12(3): 332-7.
- Perez-Villamil, B. et al., 2012. Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behavior. *BMC Cancer*, 12(1): 260.
- Phinney, D.G., 2012. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: Implications for cell therapy. *J Cell Biochem*.
- Phinney, D.G. and Prockop, D.J., 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, 25(11): 2896-902.

-
- Pike, M.C., Pearce, C.L. and Wu, A.H., 2004. Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene*, 23(38): 6379-91.
- Pirro, M. et al., 2009. Influence of short-term rosuvastatin therapy on endothelial progenitor cells and endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 14(1): 14-21.
- Piscaglia, A.C., 2008. Stem cells, a two-edged sword: risks and potentials of regenerative medicine. *World J Gastroenterol*, 14(27): 4273-9.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-7.
- Plati, J., Bucur, O. and Khosravi-Far, R., 2011. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*, 3(4): 279-96.
- Polak, J.M. and Bishop, A.E., 2006. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*, 1068: 352-66.
- Porto, I. et al., 2011. Are endothelial progenitor cells mobilized by myocardial ischemia or myocardial necrosis? A cardiac magnetic resonance study. *Atherosclerosis*, 216(2): 355-8.
- Prasain, N., Meador, J.L. and Yoder, M.C., 2012. Phenotypic and functional characterization of endothelial colony forming cells derived from human umbilical cord blood. *J Vis Exp*(62).
- Prat, A. et al., 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12(5): R68.
- Prat, A. and Perou, C.M., 2009. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*, 15(8): 842-4.
- Prat, A. and Perou, C.M., 2011. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 5(1): 5-23.
- Prater, D.N., Case, J., Ingram, D.A. and Yoder, M.C., 2007. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*, 21(6): 1141-9.
- Prockop, D.J., 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309): 71-4.
- Prud'homme, G.J., 2012. Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Curr Pharm Des*, 18(19): 2838-49.

-
- Qayyum, A.A. et al., 2012. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia (MyStromalCell Trial): study design. *Regen Med*, 7(3): 421-8.
- Qian, B.Z. et al., 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, 475(7355): 222-5.
- Qian, Q. et al., 2012. 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase. *Stem Cells Dev*, 21(1): 67-75.
- Quevedo, H.C. et al., 2009. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33): 14022-7.
- Rangappa, S., Entwistle, J.W., Wechsler, A.S. and Kresh, J.Y., 2003a. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126(1): 124-32.
- Rangappa, S., Fen, C., Lee, E.H., Bongso, A. and Sim, E.K., 2003b. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*, 75(3): 775-9.
- Rappa, G. et al., 2008. Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets. *Exp Cell Res*, 314(10): 2110-22.
- Ratajczak, M.Z. et al., 2008. Hunt for pluripotent stem cell -- regenerative medicine search for almighty cell. *J Autoimmun*, 30(3): 151-62.
- Rebelatto, C.K. et al., 2009. Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. *Biochem Biophys Res Commun*, 378(3): 456-61.
- Reedijk, M. et al., 2008. Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. *Int J Oncol*, 33(6): 1223-9.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. and Weissman, I.L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859): 105-11.
- Ricci-Vitiani, L. et al., 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123): 111-5.

-
- Ricciardi, M. et al., 2012. Comparison of epithelial differentiation and immune regulatory properties of mesenchymal stromal cells derived from human lung and bone marrow. *PLoS One*, 7(5): e35639.
- Richards, M., Fong, C.Y., Chan, W.K., Wong, P.C. and Bongso, A., 2002. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 20(9): 933-6.
- Rigotti, G. et al., 2007. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg*, 119(5): 1409-22; discussion 1423-4.
- Rock, J.R. et al., 2011. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell*, 8(6): 639-48.
- Roques, M. et al., 2012. Endoglin expression level discriminates long-term hematopoietic from short-term clonogenic progenitor cells in the aorta. *Haematologica*, 97(7): 975-9.
- Rossi, D.J., Jamieson, C.H. and Weissman, I.L., 2008. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell*, 132(4): 681-96.
- Roux, N. et al., 2011. Progenitor Cell Mobilizing Treatments Prevent Experimental Transplant Arteriosclerosis. *J Surg Res*.
- Rowehl, R.A., Crawford, H., Dufour, A., Ju, J. and Botchkina, G.I., 2008. Genomic analysis of prostate cancer stem cells isolated from a highly metastatic cell line. *Cancer Genomics Proteomics*, 5(6): 301-10.
- Roy, D., Dorak, M.T. and SpringerLink (Online service), 2010a. Environmental factors, genes, and the development of human cancers. Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, pp. xiii, 520 pp.
- Roy, R., Willan, P.M., Clarke, R. and Farnie, G., 2010b. Differentiation therapy: targeting breast cancer stem cells to reduce resistance to radiotherapy and chemotherapy. *Breast Cancer Res*, 12(Suppl 1): 05.
- Roy, S. and Majumdar, A.P., 2012. Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal*, 7(1): 11.
- Royer, P.J. et al., 2006. Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Scand J Immunol*, 63(6): 401-9.

- Rzhaninova, A.A., Gornostaeva, S.N. and Goldshtein, D.V., 2005. Isolation and phenotypical characterization of mesenchymal stem cells from human fetal thymus. *Bull Exp Biol Med*, 139(1): 134-40.
- Sabapathy, V., Ravi, S., Srivastava, V., Srivastava, A. and Kumar, S., 2012. Long-term cultured human term placenta-derived mesenchymal stem cells of maternal origin displays plasticity. *Stem Cells Int*, 2012: 174328.
- Sabin, F.R., Doan, C.A. and Forkner, C.E., 1932. The Production of Osteogenic Sarcomata and the Effects on Lymph Nodes and Bone Marrow of Intravenous Injections of Radium Chloride and Mesothorium in Rabbits. *J Exp Med*, 56(2): 267-89.
- Saharinen, P., Bry, M. and Alitalo, K., 2010. How do angiopoietins Tie in with vascular endothelial growth factors? *Curr Opin Hematol*, 17(3): 198-205.
- Saigusa, S. et al., 2012. Clinical significance of LGR5 and CD44 expression in locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Int J Oncol*, 41(5): 1643-52.
- Saini, V. and Shoemaker, R.H., 2010. Potential for therapeutic targeting of tumor stem cells. *Cancer Sci*, 101(1): 16-21.
- Saito, F. et al., 2008. Spinal cord injury treatment with intrathecal autologous bone marrow stromal cell transplantation: the first clinical trial case report. *J Trauma*, 64(1): 53-9.
- Salingcarnboriboon, R. et al., 2003. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res*, 287(2): 289-300.
- Sánchez Pérez, I., Salguero Bodes, R. and Sáenz de la Calzada, C., 2005. Cardiopatía isquémica. Concepto. Aspectos epidemiológicos. Etiopatogenia. Clasificación biológica y clínica. Implicaciones en la calidad de vida. *Medicine*, 9(39): 2571-2579.
- Santarosa, M. and Maestro, R., 2012. BRACKing news on triple-negative/basal-like breast cancers: how BRCA1 deficiency may result in the development of a selective tumor subtype. *Cancer Metastasis Rev*, 31(1-2): 131-42.
- Sarkar, A., 2009. *Biology of Cancer*. Discovery Pub. House, New Delhi, 334 pp.
- Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M.M. and Davies, J.E., 2005. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, 23(2): 220-9.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J. and Shimizu, K., 2011. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J*, 278(10): 1598-609.

-
- Sawa, Y. et al., 2012. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today*, 42(2): 181-4.
- Schatteman, G.C., Dunnwald, M. and Jiao, C., 2007. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(1): H1-18.
- Schwab, K.E. and Gargett, C.E., 2007. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod*, 22(11): 2903-11.
- Sekiya, I. et al., 2012. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res*, 30(6): 943-9.
- Sell, S., 2004. *Stem cells handbook*. Humana Press, Totowa, N.J., xiii, 509 pp.
- Sen Banerjee, S. et al., 2012. HIF-prolyl hydroxylases and cardiovascular diseases. *Toxicol Mech Methods*, 22(5): 347-58.
- Sen, S., McDonald, S.P., Coates, P.T. and Bonder, C.S., 2011. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*, 120(7): 263-83.
- Senger, D.R., 2010. Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. *Mol Biol Cell*, 21(3): 377-9.
- Serrano Hernando, F.J. and Martin Conejero, A., 2007. Peripheral artery disease: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Rev Esp Cardiol*, 60(9): 969-82.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R. and Morrison, S.J., 2009. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5): 822-9.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J.V., Jr., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28(5): 815-20.
- Shi, Q. et al., 1998. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92(2): 362-7.
- Shi, Y. et al., 2010. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, 20(5): 510-8.
- Shim, W.S. et al., 2004. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(2): 481-8.

-
- Shmelkov, S.V. et al., 2008. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*, 118(6): 2111-20.
- Smadja, D.M. et al., 2012. Early endothelial progenitor cells in bone marrow are a biomarker of cell therapy success in patients with critical limb ischemia. *Cytotherapy*, 14(2): 232-9.
- Soares, J., Lowe, M.M. and Jarstfer, M.B., 2011. The catalytic subunit of human telomerase is a unique caspase-6 and caspase-7 substrate. *Biochemistry*, 50(42): 9046-55.
- Soares, R. et al., 2004. Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. *Mol Endocrinol*, 18(9): 2333-43.
- Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C. and International Union against Cancer., 2010. TNM classification of malignant tumours. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ, xx, 310 pp.
- Sobrinho, T., Blanco, M., Perez-Mato, M., Rodriguez-Yanez, M. and Castillo, J., 2012a. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with ischaemic stroke treated with statins during acute phase. *Eur J Neurol*.
- Sobrinho, T. et al., 2012b. Temporal profile of molecular signatures associated with circulating endothelial progenitor cells in human ischemic stroke. *J Neurosci Res*.
- Sondergaard, C.S. et al., 2010. Human thymus mesenchymal stromal cells augment force production in self-organized cardiac tissue. *Ann Thorac Surg*, 90(3): 796-803; discussion 803-4.
- Soria, G. and Ben-Baruch, A., 2008. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett*, 267(2): 271-85.
- Southam, C.M. and Brunschwig, A., 1961. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer*, 14(5): 971-978.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C. and Moretta, L., 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4): 1484-90.
- Spiegelman, B.M., 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 47(4): 507-14.

-
- Stamm, C. et al., 2007. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 133(3): 717-25.
- Steindler, D.A., 2007. Stem cells, regenerative medicine, and animal models of disease. *ILAR J*, 48(4): 323-38.
- Stephoe, P.C. and Edwards, R.G., 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2(8085): 366.
- Stevens, L.C., 1960. Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse. *Dev Biol*, 2: 285-97.
- Stevens, L.C., 1962. The biology of teratomas including evidence indicating their origin from primordial germ cells. *Annee Biol*, 1: 585-610.
- Stevens, L.C., 1964. Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52: 654-61.
- Stevens, L.C., 1968. The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol*, 20(3): 329-41.
- Strauss, R., Hamerlik, P., Lieber, A. and Bartek, J., 2012. Regulation of Stem Cell Plasticity: Mechanisms and Relevance to Tissue Biology and Cancer. *Mol Ther*, 20(5): 887-897.
- Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukhareno, V. and Verlinsky, Y., 2004. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online*, 9(6): 623-9.
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O. and Michalek, J., 2012. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells Dev*.
- Stubbs, S.L. et al., 2012. Hypoxic Preconditioning Enhances Survival of Human Adipose-Derived Stem Cells and Conditions Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells Dev*.
- Subramaniam, D., Ramalingam, S., Houchen, C.W. and Anant, S., 2010. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *Mini Rev Med Chem*, 10(5): 359-71.
- Subramaniam, V. et al., 2009. Bone marrow mobilization with granulocyte macrophage colony-stimulating factor improves endothelial dysfunction and exercise capacity in patients with peripheral arterial disease. *Am Heart J*, 158(1): 53-60 e1.

-
- Suga, H. et al., 2009. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 18(8): 1201-10.
- Suzuki, Y., Yamamoto, K., Ando, J., Matsumoto, K. and Matsuda, T., 2012. Arterial shear stress augments the differentiation of endothelial progenitor cells adhered to VEGF-bound surfaces. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Swistowski, A. et al., 2009. Xeno-free defined conditions for culture of human embryonic stem cells, neural stem cells and dopaminergic neurons derived from them. *PLoS One*, 4(7): e6233.
- Taira, N. and Yoshida, K., 2012. Post-translational modifications of p53 tumor suppressor: determinants of its functional targets. *Histol Histopathol*, 27(4): 437-43.
- Takahashi, H. et al., 2011. Significance of Lgr5(+ve) cancer stem cells in the colon and rectum. *Ann Surg Oncol*, 18(4): 1166-74.
- Takahashi, K. et al., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5): 861-72.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4): 663-76.
- Takashima, Y. et al., 2007. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*, 129(7): 1377-88.
- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q. and Ivy, S.P., 2011. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(2): 97-106.
- Taljaard, M. et al., 2010. Rationale and design of Enhanced Angiogenic Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction (ENACT-AMI): the first randomized placebo-controlled trial of enhanced progenitor cell therapy for acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 159(3): 354-60.
- Talmadge, J.E. and Fidler, I.J., 2010. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, 70(14): 5649-69.
- Tang, Y. et al., 2011. Ginkgolide B promotes proliferation and functional activities of bone marrow-derived endothelial progenitor cells: involvement of Akt/eNOS and MAPK/p38 signaling pathways. *Eur Cell Mater*, 21: 459-69.
- Tarkowski, A.K., 1961. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature*, 190: 857-60.

- Tauzin, S., Debure, L., Moreau, J.F. and Legembre, P., 2012. CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations. *Cell Mol Life Sci*, 69(8): 1261-77.
- Tavassoli, F.A., Devilee, P., World Health Organization. and International Agency for Research on Cancer., 2003. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. World Health Organization classification of tumours. IARC, Lyon, 432 pp.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y. and Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5): 871-90.
- Thomson, A.B., Doring, K., Keelan, M. and Armstrong, G., 1997. Nutrient uptake into undifferentiated and differentiated HT-29 cells in culture. *Can J Physiol Pharmacol*, 75(5): 351-6.
- Thomson, J.A. et al., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391): 1145-7.
- Tian, Z.M. et al., 2009. Clinical study of transplantation of neural stem cells in therapy of inherited cerebellar atrophy. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 41(4): 456-8.
- Till, J.E. and McCulloch, E.A., 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14: 213-22.
- Till, J.E., McCulloch, E.A. and Siminovitch, L., 1964. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51: 29-36.
- Tilling, L., Hunt, J., Donald, A., Clapp, B. and Chowienczyk, P., 2012. Darbepoetin enhances endothelium-dependent vasomotor function in patients with stable coronary artery disease only after preceding ischaemia/reperfusion. *Clin Sci (Lond)*, 122(7): 329-36.
- Timmermans, F. et al., 2009. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*, 13(1): 87-102.
- Timmermans, F. et al., 2007. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(7): 1572-9.
- Titorencu, I. et al., 2007. Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells. *Cytotherapy*, 9(7): 682-96.
- Tobias, J.S., Hochhauser, D., Souhami, R.L.C. and its, m., 2010. Cancer and its management. Wiley-Blackwell, Oxford.

-
- Todaro, M. et al., 2007. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell*, 1(4): 389-402.
- Tosh, D. and Slack, J.M., 2002. How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3): 187-94.
- Trachtenberg, B. et al., 2011. Rationale and design of the Transendocardial Injection of Autologous Human Cells (bone marrow or mesenchymal) in Chronic Ischemic Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure Secondary to Myocardial Infarction (TACHFT) trial: A randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy. *Am Heart J*, 161(3): 487-93.
- Trzpis, M., McLaughlin, P.M., de Leij, L.M. and Harmsen, M.C., 2007. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol*, 171(2): 386-95.
- Uchino, M. et al., 2010. Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*, 10: 414.
- UN, 2011. World Population Prospects, the 2010 revision. Population database. New York, United States: United Nations. Available from: <http://www.un.org>, accessed on 29 June 2012.
- Urbich, C. et al., 2005. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*, 39(5): 733-42.
- Ustrell-Roig, X. and Serena-Leal, J., 2007. Stroke. Diagnosis and therapeutic management of cerebrovascular disease. *Rev Esp Cardiol*, 60(7): 753-69.
- Vaculik, C. et al., 2012. Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. *J Invest Dermatol*, 132(3 Pt 1): 563-74.
- Vaiopoulos, A.G., Kostakis, I.D., Koutsilieris, M. and Papavassiliou, A.G., 2012. Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*, 30(3): 363-71.
- Valastyan, S. and Weinberg, R.A., 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2): 275-92.
- Valeri, N. et al., 2010. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(15): 6982-7.

-
- Van Hoof, D. et al., 2008. Feeder-free monolayer cultures of human embryonic stem cells express an epithelial plasma membrane protein profile. *Stem Cells*, 26(11): 2777-81.
- Van Keymeulen, A. et al., 2011. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*, 479(7372): 189-93.
- van Wezel, T., Middeldorp, A., Wijnen, J.T. and Morreau, H., 2012. A review of the genetic background and tumour profiling in familial colorectal cancer. *Mutagenesis*, 27(2): 239-45.
- Vander Heiden, M.G., 2011. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9): 671-84.
- Vassilopoulos, A. et al., 2008. Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumors using markers for normal mammary stem cells. *Int J Biol Sci*, 4(3): 133-42.
- Verga Falzacappa, M.V., Ronchini, C., Reavie, L.B. and Pelicci, P.G., 2012. Regulation of self-renewal in normal and cancer stem cells. *FEBS J*, 279(19): 3559-72.
- Vermeulen, L. et al., 2008. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(36): 13427-32.
- Vinogradov, S. and Wei, X., 2012. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*, 7(4): 597-615.
- Vira, D. et al., 2012. Cancer stem cells, microRNAs, and therapeutic strategies including natural products. *Cancer Metastasis Rev*.
- Virchow, R., 1855. "Embryonal-rest hypothesis". *Arch Path Anat Physiol Klin Med* 8: 23-54.
- Visus, C. et al., 2011. Targeting ALDH(bright) human carcinoma-initiating cells with ALDH1A1-specific CD8(+) T cells. *Clin Cancer Res*, 17(19): 6174-84.
- Visvader, J.E., 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330): 314-22.
- Visvader, J.E. and Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 8(10): 755-68.
- Viswanathan, C. et al., 2010. Transplantation of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells trans-epicardially in patients undergoing coronary bypass surgery. *Indian Heart J*, 62(1): 43-8.

-
- Vogel, C., Hager, C. and Bastians, H., 2007. Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res*, 67(1): 339-45.
- Vogel, S. et al., 2010. Hepatocyte growth factor-mediated attraction of mesenchymal stem cells for apoptotic neuronal and cardiomyocytic cells. *Cell Mol Life Sci*, 67(2): 295-303.
- Vona-Davis, L. and Rose, D.P., 2009. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20(3): 193-201.
- Vries, R.G., Huch, M. and Clevers, H., 2010. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol*, 4(5): 373-84.
- Walia, V. and Elble, R.C., 2010. Enrichment for breast cancer cells with stem/progenitor properties by differential adhesion. *Stem Cells Dev*, 19(8): 1175-82.
- Wang, G.G., Allis, C.D. and Chi, P., 2007a. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med*, 13(9): 363-72.
- Wang, J. et al., 2012a. Clock is not a component of Z-bands. *Cytoskeleton (Hoboken)*.
- Wang, L., 2006. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med*, 16(3): 89-94.
- Wang, N. et al., 2012b. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry: a valuable tool for diagnosis and prognosis evaluation. *Tumour Biol*, 33(2): 561-9.
- Wang, Q. et al., 2005. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells*, 23(9): 1221-7.
- Wang, S., Qu, X. and Zhao, R.C., 2012c. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*, 5: 19.
- Wang, X., Cheung, H.W., Chun, A.C., Jin, D.Y. and Wong, Y.C., 2008. Mitotic checkpoint defects in human cancers and their implications to chemotherapy. *Front Biosci*, 13: 2103-14.
- Wang, X.X. et al., 2007b. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol*, 49(14): 1566-71.

-
- Watorek, E., Paprocka, M., Dus, D., Kopec, W. and Klinger, M., 2011. Endostatin and vascular endothelial growth factor: potential regulators of endothelial progenitor cell number in chronic kidney disease. *Pol Arch Med Wewn*, 121(9): 296-301.
- Waugh, D.J. and Wilson, C., 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 14(21): 6735-41.
- Webber, M.J. et al., 2010. Capturing the stem cell paracrine effect using heparin-presenting nanofibres to treat cardiovascular diseases. *J Tissue Eng Regen Med*, 4(8): 600-10.
- Wei, B. and Jin, J.P., 2011. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. *Arch Biochem Biophys*, 505(2): 144-54.
- Weichert, W., Knosel, T., Bellach, J., Dietel, M. and Kristiansen, G., 2004. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol*, 57(11): 1160-4.
- Weismann, A., 1885. *Die Kontinuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung*. Fischer, Jena.
- Wels, J., Kaplan, R.N., Rafii, S. and Lyden, D., 2008. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev*, 22(5): 559-74.
- Werner, C., Kamani, C.H., Gensch, C., Bohm, M. and Laufs, U., 2007. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Diabetes*, 56(10): 2609-15.
- Wiechmann, L. et al., 2009. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol*, 16(10): 2705-10.
- Wijelath, E.S. et al., 2004. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. *J Vasc Surg*, 39(3): 655-60.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619): 810-3.
- Willis, N.D., Przyborski, S.A., Hutchison, C.J. and Wilson, R.G., 2008. Colonic and colorectal cancer stem cells: progress in the search for putative biomarkers. *J Anat*, 213(1): 59-65.
- Wong, R.S., 2011. Mesenchymal stem cells: angels or demons? *J Biomed Biotechnol*, 2011: 459510.

-
- Wright, M.H. et al., 2008. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*, 10(1): R10.
- Wu, C. and Alman, B.A., 2008. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*, 268(1): 1-9.
- Xiang, R. et al., 2011. Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. *Br J Cancer*, 104(9): 1410-7.
- Xu, C. et al., 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 19(10): 971-4.
- Xue, S. et al., 2010. Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury. *Neurosci Lett*, 473(3): 186-91.
- Yamamoto, K. et al., 2003. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol*, 95(5): 2081-8.
- Yang, W.Z. et al., 2011. Human umbilical cord blood-derived mononuclear cell transplantation: case series of 30 subjects with hereditary ataxia. *J Transl Med*, 9: 65.
- Yang, Z.J. et al., 2009. Hepatocyte growth factor plays a critical role in the regulation of cytokine production and induction of endothelial progenitor cell mobilization: a pilot gene therapy study in patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36(8): 790-6.
- Yara Sánchez, J.E., 2008. *Enfermedades Vasculares Periféricas*. Centro Provincial de Información de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba.
- Yeung, T.M., Gandhi, S.C., Wilding, J.L., Muschel, R. and Bodmer, W.F., 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(8): 3722-7.
- Yip, H.K. et al., 2011. Effect of erythropoietin on level of circulating endothelial progenitor cells and outcome in patients after acute ischemic stroke. *Crit Care*, 15(1): R40.
- Yiu, K.H. et al., 2010. Role of circulating endothelial progenitor cells in patients with rheumatoid arthritis with coronary calcification. *J Rheumatol*, 37(3): 529-35.
- Yochum, G.S., 2011. Multiple Wnt/ss-catenin responsive enhancers align with the MYC promoter through long-range chromatin loops. *PLoS One*, 6(4): e18966.
- Yoder, M.C., 2010. Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(6): 1094-103.

-
- Yoon, C.H. et al., 2005. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*, 112(11): 1618-27.
- Yu, S., Zhang, R., Liu, F., Hu, H. and Wang, H., 2011. Down-regulation of Notch signaling by a gamma-secretase inhibitor enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Rep*, 26(5): 1323-8.
- Yuan, H., Liu, H., Tian, R., Li, J. and Zhao, Z., 2012. Regulation of mesenchymal stem cell differentiation and insulin secretion by differential expression of Pdx-1. *Mol Biol Rep*, 39(7): 7777-83.
- Yue, Q.X., Liu, X. and Guo, D.A., 2010. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med*, 76(11): 1037-43.
- Zabierowski, S.E. and Herlyn, M., 2008. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol*, 26(17): 2890-4.
- Zemani, F. et al., 2008. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(4): 644-50.
- Zeyda, M. et al., 2010. Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression. *Int J Obes (Lond)*, 34(12): 1684-94.
- Zhang, H. et al., 2012a. Not All Side Population Cells Contain Cancer Stem-Like Cells in Human Gastric Cancer Cell Lines. *Dig Dis Sci*.
- Zhang, W. et al., 2004. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*, 13(3): 263-71.
- Zhang, Z. et al., 2012b. Apolipoprotein A-I mimetic peptide D-4F promotes human endothelial progenitor cell proliferation, migration, adhesion through eNOS/NO pathway. *Mol Biol Rep*, 39(4): 4445-54.
- Zhang, Z.Y. et al., 2009. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 27(1): 126-37.
- Zhang, Z.Y. et al., 2012c. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. *Biomaterials*, 33(9): 2656-72.

-
- Zhao, T., Zhang, Z.N., Rong, Z. and Xu, Y., 2011a. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474(7350): 212-5.
- Zhao, X.Y. et al., 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 461(7260): 86-90.
- Zhao, Z., Liao, L., Cao, Y., Jiang, X. and Zhao, R.C., 2005. Establishment and properties of fetal dermis-derived mesenchymal stem cell lines: plasticity in vitro and hematopoietic protection in vivo. *Bone Marrow Transplant*, 36(4): 355-65.
- Zhao, Z.L., Xu, D.L., Guo, Z.G., Wu, P.S. and Shen, A.N., 2011b. Effect of granulocyte colony stimulating factor EPC on cardiac function in patients with heart failure after myocardial infarction. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 31(3): 504-7.
- Zhou, J.X. et al., 2012. Gamma-secretase inhibition combined with cisplatin enhances apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells. *Exp Ther Med*, 3(2): 357-361.
- Zhou, L. et al., 2010. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat*, 122(3): 795-801.
- Zhu, C. et al., 2008a. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20-regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix. *Biomaterials*, 29(17): 2628-36.
- Zhu, M.X., Zhao, J.Y. and Chen, G.A., 2012. Mesoderm is committed to hemato-endothelial and cardiac lineages in human embryoid bodies by sequential exposure to cytokines. *Exp Cell Res*.
- Zhu, Y. et al., 2008b. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*, 26(6): 664-75.
- Zuk, P.A. et al., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12): 4279-95.
- Zuk, P.A. et al., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2): 211-28.

GLOSSARY

5-aza: 5-Azacytidine	BAA: BODIPY™-Aminoacetato
ABC: ATP-Binding Cassette	BAAA: BODIPY™-Aminoacetaldehyde
ACEi: Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor	BB: Blocking Buffer
Ac-LDL: Acetylated Low Density Lipoprotein	BCRP: Breast Cancer Resistance Protein
ALDH: Aldehyde Dehydrogenase	BCSC: Breast Cancer Stem Cells
AM: Acetoxymethyl	β-MHC: β-Myosin Heavy Chain
AMI: Acute Myocardial Infarction	BMP: Bone Morphogenetic Protein
ANG: Angiopoietin	BMSC: Bone Marrow Stromal Cells
APC: Allophycocyanin	bp: Base Pair
APC-Cy7: Allophycocyanin-Cyanin7	BrdU: Bromodeoxyuridine
APS: Ammonium Persulfate	BRCA: Breast Cancer
AR: Androgen Receptor	BSA: Bovine Serum Albumin
ASC: Adult Stem Cells	BSF-2: B-Cell Stimulatory Factor-2
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated	CAF: Cancer-Associated Fibroblasts
ATRA: Angiotensin Receptor Antagonist	CASP: Caspase
	CBF1: Core Binding Factor1

CBVD: Cerebrovascular Diseases	DAPT: N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-Alanyl]-S-Phenylglycine T-Butyl Ester
CCL: Chemokine (C-C motif) Ligand	DEAB: Diethylaminobenzaldehyde
CCSC: Colon Cancer Stem Cells	DHh: Desert Hedgehog
cDNA: Complementary Deoxyribonucleic Acid	DLL: Delta-Like Ligands
CEPC: Circulating Endothelial Progenitor Cells	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
CEC: Circulating Endothelial Cells	DMEM-FBS: DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin
CIMP: CpG Island Methylator Phenotype	DMSO: Dimethyl Sulfoxide
CIN: Chromosomal Instability	DNA: Deoxyribonucleic Acid
CpG: Cytosine-phospho-Guanine	dNTP: Deoxyribonucleotid-Triphosphate
CSC: Cancer Stem Cells	DTT: Dithiothreitol
CVD: Cardiovascular diseases	EBM-2: Endothelial Basal Medium-2
CXCL: Chemokine (C-X-C motif) Ligand	EC: Mature Endothelial Cells
DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride	ECM: Extracellular Matrix
	EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

EGF: Epidermal Growth Factor

ESC: Embryonic Stem Cells

eGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

ESC-TF: Embryonic Stem Cells-Transcription Factors

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

EGM-2: EBM-2 + 2% FBS + VEGF + FGF + R3-IGF-1 + rhEGF + hydrocortisone + ascorbic acid + gentamicin sulfate + amphotericin b

FADD: FAS-Associated Death Domain Protein

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FAS: Fatty Acid Synthase

EMT: Epithelial-to-Mesenchymal Transition

FBS: Fetal Bovine Serum

EndMT: Endothelial-to-Mesenchymal Transition

FGF: Fibroblast Growth Factor

eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

EOC: Endothelial Outgrowth Cells

FLIP: FLICE-Inhibitory Proteins

EPC: Endothelial Progenitor Cells

FLK-1: Fetal Liver Kinase 1

ER: Estrogen Receptor

FLT-1: FMS-Like Tyrosine Kinase 1

ERK: Extracellular-Signal-Regulated Kinases

Fw: Forward

GAG: Glycosaminoglycan

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GDF-5: Growth and Differentiation Factor-5

GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GMP: Good Manufacturing Practices

GSI: γ -Secretase Inhibitors

hASC: Human Adipose-Derived Stem Cells

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HGF: Hepatocyte Growth Factor

Hh: Hedgehog

HIF: Hypoxia-Inducible Factor

HLA: Human Leukocyte Antigen

HME: High-Methylation Epigenotype

HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer

HPI: Hedgehog Protein Inhibitors

HRP: Horseradish Peroxidase

HSC: Hematopoietic Stem Cells

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins

IARC: International Agency for Research on Cancer

ICM: Inner Cell Mass

IDO: Indoleamine 2,3-Dioxygenase

IFN: Interferón

Ig: Immunoglobulin

IHh: Indian Hedgehog

IL: Interleukin

IME: Intermediate-Methylation Epigenotype

iNOS: Inducible Nitric-Oxide Synthase	MDR: Multidrug Resistance
IP-10: Interferon- γ -Inducible Protein-10	ME-LC: Multipotent Endothelial-Like Cells
iPS: Induced Pluripotent Stem	MET: Mesenchymal-to-Epithelial Transition
ISCT: International Society for Cellular Therapy	MIAMI: Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible
IVIS: <i>In Vivo</i> Imagen System	miRNA: microRNA
KDR: Kinase Insert Domain Receptor	MMP: Matrix Metaloproteinases
L2G: Luc2-eGFP	MMR: Mismatch Repair
LGR5: Leucine-Rich-Repeat Containing G-Protein-Coupled Receptor 5	mRNA: messenger RNA
LME: Low-Methylation Epigenotype	miRNA: microRNA
Luc2: Luciferase Modified	MSC: Mesenchymal Stem Cells
MACS: Magnetic-Activated Cell Sorting	MSI: Microsatellite Instability
MAPC: Multipotent Adult Progenitor Cells	MSI-H: Microsatellite Instability-High
MaSC: Mammary Stem Cells	MSI-L: Microsatellite Instability-Low
MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1	MSS: Microsatellite Stable

MYL2: Myosin Regulatory Light Chain 2

NICD: NOTCH Intracellular Domain

NO: Nitric Oxide

NOD/SCID: Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency

OD: Optical Density

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor

PE: Phycoerythrin

PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1

PFA: Paraformaldehyde

PGE2: Prostaglandin E2

PHD: Prolyl Hydroxylase Domain

PI: Propidium Iodide

PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase

PLA: Processed Lipoaspirate

PPAR- γ : Proliferator-Activated Receptor- γ

PR: Progesterone Receptor

PTCH1: Patched1

PVDF: Polyvinylidene Difluoride

R3-IGF-1: Insuline-like Growth Factor I long R3

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted

RB: Retinoblastoma

Rev: Reverse

RNA: Ribonucleic Acid

RT: Reverse Transcriptase

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SANT: SMO Antagonists	TB: Trypan Blue
SC: Stem Cells	TEK: Tyrosine Endothelial Kinase
SCF: Sphere Cluster Formation	TEMED: Tetramethyle-Ethylendyamine
SDF-1: Stromal Derived Factor-1	TGF-β: Transforming Growth Factor- β
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate	TIC: Tumor-Initiating Cells
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	TIE-2: Tyrosine Kinase with Ig and EGF Homology Domains-2
SE: Standard Error	Tm: Melting Temperature
SFO3: RPMI1640: DMEM: F12 + 0,1% BSA + 50 μ M 2- β -Mercaptoetanol + 1% Penicillin-Streptomycin	TNF: Tumor Necrosis Factor
SHh: Sonic Hedgehog	TP53: Tumor Protein p53
SMO: Smoothened	TRICT: Tetramethylrhodamine Isothiocyanate
SP: Side Population	UEA-1: <i>Ulex europaeus</i> Agglutinin-1
SVF: Stromal Vascular Fraction	UICC: International Union Against Cancer
TA: Transit Amplifying	UV: Ultraviolet
TAE: Tris-Acetate-EDTA	VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
TAF: Tumor-Associated Fibroblasts	

VEGFR: Vascular Endothelial Growth
Factor Receptor

WIF-1: Wnt Inhibitory Factor-1

vol: Volume

wt: Weight

VSEL: Very Small Embryonic-Like

APPENDIX

Purification and Long-Term Expansion of Multipotent Endothelial-Like Cells with Potential Cardiovascular Regeneration

Juan A. Marchal,^{1,2,*} Manuel Picón,^{1,2,*} Macarena Perán,^{1,3} Clara Bueno,⁴ Manuel Jiménez-Navarro,⁵ Esmeralda Carrillo,^{1,2} Houria Boulaiz,^{1,2} Noela Rodríguez,⁵ Pablo Álvarez,¹ Pablo Menendez,⁴ Eduardo de Teresa,⁵ and Antonia Aránega^{1,2}

Endothelial progenitor cells (EPC) represent a relatively rare cell population, and expansion of sufficient cell numbers remains a challenge. Nevertheless, human adipose-derived stem cells (hASC) can be easily isolated and possess the ability to differentiate into endothelial cells. Here, we propose the isolation and characterization of multipotent endothelial-like cells (ME-LC) with the capacity to maintain their vascular progenitor properties for long periods. hASC were isolated from lipoaspirates and cultured through distinct consecutive culture stages for 2 months to enrich ME-LC: first in Dulbecco's modified Eagle's medium–fetal bovine serum (stage I), followed by a stage of culture in absent of fetal bovine serum (stage II), a culture in SFO3 medium (stage III), and, finally, the culture of ME-LC into collagen IV-coated flasks in endothelial growth medium (EGM-2) (stage IV). ME-LC display increased expression levels of endothelial and hematopoietic lineage markers (CD45, KDR, and CXCR4) and EPC markers (CD34 and CD133), whereas the expression of CD31 was barely detectable. Reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction assays showed expression of genes involved in early stages of EPC differentiation and decreased expression of genes associated to differentiated EPC (*TIE-2*, *DLL4*, and *FLT-1*). ME-LC formed capillary-like structures when grown on Matrigel, secreted increased levels of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), and showed the ability to migrate attracted by SDF-1, vascular endothelial growth factor, and hematopoietic growth factor cytokines. Importantly, ME-LC retained the capacity to differentiate into cardiomyocyte-like cells. We present a simplified and efficient method to generate large numbers of autologous ME-LC from lipoaspirates-derived hASC, opening up potential cell-based therapies for cardiovascular regenerative medicine.

Introduction

IN THE ADULT, DIFFERENT mesodermal stem/progenitor cells have been identified, including endothelial progenitor cells (EPC), which are involved in the angiogenesis and vasculogenesis processes [1]. Upon vascular injury, EPC are mobilized from the bone marrow (BM) by cytokine secretion such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) to migrate and regenerate the damaged tissue [2].

EPC are commonly characterized by the expression of the surface markers CD34 and CD133, lack of the hematopoietic marker CD45, and co-expression of CXCR4 and VEGFR2 (KDR/flk-1) [2,3]. EPC differentiation into mature endothe-

lial cells (ECs) is accompanied by a loss of expression of CD133 and a concomitant increase in CD31 expression, CD144 (VE-cadherin), and other markers [4]. Furthermore, expression of certain genes is also used during the characterization of *bona fide* ECs. For instance, *FLT-1*, *TIE-2*, *CCR7*, and *C-KIT* are expressed on EPC, among others cell types, whereas *CDK2*, a cyclin-dependent kinase, is overexpressed on later stages of EPC differentiation and absent on early phases of EPC differentiation [5].

Blood-derived EPC or BM-derived stem cells have been used to improve myocardial perfusion and contractile function and enhance limb perfusion in patients [6,7]. However, there are still some drawbacks for their clinical utility such as the extremely low number of EPC in the bloodstream and the

¹Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Granada, Spain.

²Department of Human Anatomy and Embryology, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain.

³Department of Health Sciences, Universidad de Jaén, Jaén, Spain.

⁴Andalusian Stem Cell Bank, Centro de Investigación Biomédica, Consejería de Salud-Universidad de Granada, Granada, Spain.

⁵Heart Unit, Hospital Universitario "Virgen de la Victoria," Málaga, Spain.

*These authors contributed equally to this work.

low availability and harvesting difficulties of BM-derived stem cells. This may be severely hampered in elderly patients or due to high morbidity associated with vascular disease [8].

In contrast, human adipose-derived stem cells (hASC) can be isolated in a greater number through a safe noninvasive routinely liposuction procedure. These hASC can also be expanded in culture and differentiate into different cell types, including ECs [9]. However, to use these progenitor cells clinically in regeneration of vascular and/or heart lesions, it is necessary to develop reliable and reproducible methods to isolate and expand these cells [10].

In the present study we propose a new approach of easy-to-derive large number of multipotent endothelial-like cells (ME-LC) from human adipose tissue with the capacity to display endothelial and cardiomyocytes-like properties in culture for long periods.

Methods

Isolation and culture of hASC from human adipose tissue

Subcutaneous adipose tissue was obtained from 15 different patients by a minimally invasive procedure after signed informed consent from all patients and approval from the Ethics Committee of the Clinic University Hospital of Málaga (Spain). This study conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. In each experiment we used at least 4 lipoaspirates. Isolation and culture of hASC was performed as described previously [11,12]. hASC were cultured in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Sigma, St Louis, MO) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza, Basel, Switzerland) and 1% Penicillin–Streptomycin solution (Sigma) (DMEM-FBS).

Differentiation assays of hASC

hASC were plated at 2×10^3 cells/cm² in DMEM-FBS and were allowed to adhere for 24h. Culture medium was then replaced with specific differentiation inductive media. For adipogenic and osteogenic differentiation, cells were cultured for 2 weeks in Adipogenic Mesenchymal Stem Cells (MSC) Differentiation Bullet Kit and Osteogenic MSC Differentiation Bullet Kit (Lonza), respectively. For chondrogenic differentiation, cells growing in monolayer were cultured in NH ChondroDiff Medium (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) for 3 weeks. Recent articles published by our group have demonstrated the capability of chondrogenic differentiation of hASC in monolayer cultures [12,13]. Differentiated cell cultures were stained with Oil Red O (Amresco, Solon, OH) for adipogenic differentiation, Alizarin Red (Lonza) for osteogenic differentiation, or Toluidine Blue (Sigma) for chondrogenic differentiation [14].

ME-LC isolation and expansion

hASC were split and seeded at 3×10^6 cells/T-75 tissue culture flask (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) in DMEM-FBS (stage I). After third or fourth cell-culture passage (2 weeks), the culture medium was replaced by serum-free medium (DMEM) to induce the development of multicellular aggregates that were termed “sphere cluster formations” (SCF) (stage II) (Fig. 1). SCF were scraped off after 3

weeks and seeded in a 6-well plate at a concentration of 10–15 SCF per well in DMEM-FBS for 48h. Isolated cells were then subcultured in medium SFO3 [RPMI-1640: DMEM: F12, 0.1% bovine serum albumin, 50 μM 2-mercaptoethanol, and 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma)] (stage III) [15]. Within the next 3 weeks, cells were scraped off and seeded into collagen IV-coated flasks and grown in EC medium, endothelial basal medium-2 (EBM-2; Lonza) containing 5% FBS, and human recombinant VEGF, hydrocortisone, human recombinant epidermal growth factor, human recombinant long R insulin-like growth factor-1 (R3-IGF-1), ascorbic acid, human recombinant basic fibroblast growth factor, and gentamicin sulfate-amphotericin-B (EGM-2; Lonza) (stage IV) (Fig. 1). Cells obtained from stages III and IV were considered as ME-LC. Human umbilical vein ECs (HUVEC) were also cultured in endothelial growth medium (EGM-2) as a control.

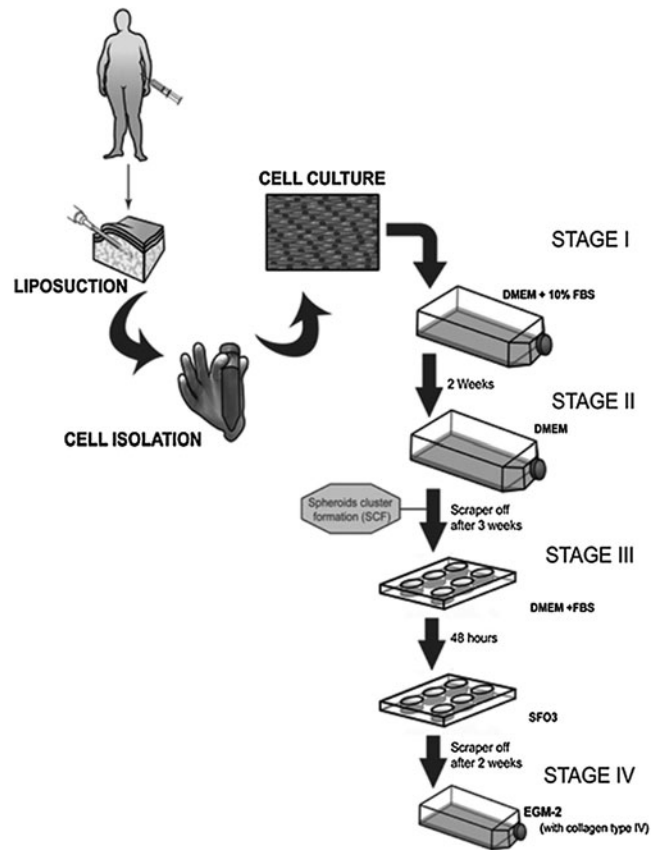


FIG. 1. Cartoon representing the ME-LC isolation and purification procedure. hASC were isolated by enzymatic digestion from lipoaspirates obtained from patients by a minimally invasive surgery. Stage I: cells cultured in DMEM-FBS for 10–14 days; stage II: cells cultured in DMEM-FBS for 10–14 days and then 2–3 weeks in DMEM; stage III: cells scrapped off from the stage II and seeded in SFO3 for about 3 weeks; stage IV: cells scrapped off from the SFO3 culture medium and cultured into collagen IV-coated flasks in EGM-2 for at least 1 week. ME-LC, multipotent endothelial-like cell; hASC, hASC, human adipose-derived stem cell; DMEM, Dulbecco’s modified Eagle’s medium; FBS, fetal bovine serum; SCF, sphere cluster formations.

Flow cytometry

Cells were trypsinized, washed, and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) with 2% bovine serum albumin (Sigma), and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma). Cells were incubated in the dark at 4°C for 45 min with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: CD133-PE (Miltenyi), CD105-APC, CD90-FITC (eBioscience Inc., San Diego, CA), KDR-APC (R&D System, Minneapolis, MN), CD34-FITC, CD45-APC-Cy7, CD73-PE, and CXCR4-PE (BD Biosciences, San Jose, CA). Cells were then washed in PBS and analyzed in a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Canto II cytometer equipped with the FACS Diva analysis software (BD Biosciences) [16]. Data obtained were expressed as mean \pm standard error (SE) from 4 independent experiments performed in triplicate ($P < 0.05$).

Gene expression profile

For reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, total RNA was extracted from cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA reaction was performed using 0.5–2 μ g of total RNA with primers from SuperScript II-kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Forward and reverse primer sequences and expected PCR product sizes for each specific gene are shown in Table 1. The PCR was performed with Reddy Mix PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Epsom, United Kingdom). After initial denaturation (2 min at 94°C) 35 cycles were performed (20 s 94°C, following by 1 min annealing and 51°C for *FLT-1*, *TIE-2*, *DLL4*, *CDK2*, and β -actin and 43°C for *CXCR4*, *CD133*, and *Ccr-7* followed by 1 min extension at 72°C). The PCR products were run on 1% agarose gel and photographed under UV light [17,18].

Functional capillary formation assays

The ability to form capillaries in semisolid medium was tested by culturing trypsinized cells on Matrigel™-coated 96-well plates (BD Biosciences) in EGM-2 medium. Matrigel™ was thawed, used to cover the culture plastic (50 μ L per well of a 96-well plate), and allowed to solidify for 1 h at 37°C. Cells from stage I to stage IV cultures were independently seeded. Outgrowths obtained from cultures at different stages of the endothelial isolation process were seeded on Matrigel™-containing plates at 5 to 20 $\times 10^3$ cells per well and cultured in EGM-2 medium for 7 days. Four hours, 24 h and 7 days after the initial plating photographs were taken using a Leica DM 5500B (Leica, Solms, Germany) microscope equipped with the Meta Systems software [19]. Figures were processed with Adobe Photoshop 7.0. Cells were counted for the formation of capillary structures. The number of capillary-like structures was measured after 24 h and each cord portion between the ramifications was considered 1 capillary unit. Mean \pm SE values were obtained by evaluating the whole cultures of each well under the same conditions from 3 independent experiments performed in duplicate. A semiquantitative measurement of capillary formation on Matrigel™ was performed as described elsewhere (capillary formation index) [20,21], using HUVEC-like control.

TABLE 1. SEQUENCES OF THE PRIMERS USED IN THE REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTIONS

Gene	Primer sequences	Product size (bp)
<i>CD133</i>	Fw: 5'-CTA GAT ACT GCT GTT GAT GTC-3' Rev: 5'-TCC TTG TAG ACC CAG AAA CT-3'	361
<i>Ccr7</i>	Fw: 5'-CAG CCT TCC TGT GTG GTT-3' Rev: 5'-AGG AAC CAG GCT TTA AAG T-3'	219
<i>Tie-2</i>	Fw: 5'-AAC TCT GTG TGC AAC TGG TCC-3' Rev: 5'-AAG TCA TCT TCC GAG CTT GG-3'	181
<i>CXCR4</i>	Fw: 5'-AGA ACC AGC GGT TAC CAT-3' Rev: 5'-ATG CCA GTT AAG AAG ATG AT-3'	174
<i>Dll4</i>	Fw: 5'-ACT ACT GCA CCC ACC ACT CC-3' Rev: 5'-CCT GTC CAC TTT CTT CTC GC-3'	359
<i>Cdk2</i>	Fw: 5'-CCT GGC ACT GAG ACT GAG GG-3' Rev: 5'-CTC AGA ATC TCC AGG GAA CAG G-3'	516
<i>Flt-1</i>	Fw: 5'-CAC CAA GAG CGA CGT GTG-3' Rev: 5'-TTT TGG GTC TCT GTG CCA G-3'	196
β -actin	Fw: 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AA-3' Rev: 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3'	318

Cytokine determination

The production of the chemokine SDF-1 in different cultures was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). First, serum and other supplements were removed from the culture medium to avoid potential interference with the measurements. Cell culture supernatants were collected 24 h later and were used for the assay. ELISA was performed using the Human SDF-1 Kit (R&D System), according to the manufacturer's protocol, and the measurements of emitted signal at 450 nm were taken with the ELx800™ microplate absorbance reader (Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany). All data about SDF-1 secretion were compared taking account the same number of cells in each culture stage (5×10^5 cells) and were obtained from 4 independent experiments performed in duplicate.

Migration assays

To determine cell migration, a modified Boyden chamber assay was performed using a 24-well microchemotaxis chamber (BD Biosciences). About 10^5 cells growing in collagen IV-coated flasks in EGM-2 medium (stage IV) were seeded onto the upper Boyden chamber in EBM-2 medium supplemented with 10% FBS. In the lower chamber, a culture

medium containing 50 ng/mL of VEGF, 25 ng/mL of hematopoietic growth factor (HGF), and 100 ng/mL of SDF-1 was added. Cells were labelled with 5 μ M of calcein AM (Invitrogen) and they were photographed using a confocal microscope (Leica DMI6000). The nonmigrating cells in the upper chamber were scraped off using blunt-ended forceps and swabs, and washed with PBS. Moreover, after 1–12 h incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, the cells were fixed in 2% paraformaldehyde for 5 min and washed in PBS. The fluorescence from the cells migrated to the lower chamber was measured using a fluorescence microplate reader (FLx800; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) from the bottom at 485/535 nm wavelength. The migrated cells were represented by the ratio of fluorescence as compared to the control.

Cardiac differentiation

ME-LC (stages III and VI) were seeded at 5–20 $\times 10^3$ cells per well of a Matrigel™-coated 96-well plate in EGM-2 medium. Culture medium was replaced 2 weeks later by EBM-2 containing 5–10 or 15 μ M of 5-azacytidine (5-aza) for 24–48 h. Culture medium was changed back to EGM-2 and cells were cultured for 3–4 weeks. Cells were then detached from Matrigel™ with dispase (BD Biosciences) and seeded in a 8-well chamber slide (Nunc, Rochester, NY) at 5–10 $\times 10^3$ cells per well for 4 days in EGM-2 for immunofluorescence analysis.

Immunofluorescence

Cells were washed 3 times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature. Then, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min, washed 3 times with PBS, and blocked in 2% blocking buffer solution (Roche, Barcelona, Spain) for 1 h at room temperature. Cells were then incubated overnight with primary antibodies diluted 1:100 in blocking buffer solution at 4°C, washed 3 times in PBS, and then incubated for 2 h with secondary (FITC- or TRITC-conjugated) antibodies diluted 1:200 in blocking buffer solution. Afterward, they were washed 3 times in PBS and slides were mounted with 4', 6-diamidino-2-phenylindole-containing mounting solution (Ultra Cruz™ Mounting Medium; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Cells treated in the same way but incubated with isotype-matched control antibodies were used like negative control. Antibodies used were as follows: human desmin (Goat monoclonal; Sigma); human cardiac-specific troponin T (mouse monoclonal; Research Diagnostics, Flanders, NJ); and human sarcomeric α -actinin (mouse monoclonal; Sigma). Photographs were taken with a Leica DM 5500B fluorescent microscope equipped with Meta Systems software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal–Wallis *H*-test for independent experiments. Significant differences between groups were estimated using the Mann–Whitney *U*-test. For the statistical analysis SPSS 15.0 software program was used. Data are presented as mean \pm SE. *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

hASC obtained from lipoaspirates possess MSC properties

hASC isolated from human lipoaspirates were maintained in culture for >10 weeks with no signs of senescence. FACS characterization showed that ex vivo cultured hASC expressed the surface markers CD105 (>99%), CD90 (>90%), and CD73 (>99%) but lacked expression for both hematopoietic and EC markers CD45, CD34, CD133, CXCR4, and KDR (Fig. 2A). Cells cultured in adipogenic medium acquired typical morphology of lipid-laden cells containing intracellular lipid-filled droplets, which stained positive for Oil Red O. Alizarin Red S staining demonstrated the presence of osteogenic differentiation, with the presence of mineralized nodules as shown in Fig. 2B. Chondrogenic differentiation was confirmed by toluidine blue staining showing accumulation of proteoglycans (Fig. 2B).

ME-LC isolation and expansion

ME-LC were isolated through a series of consecutive stages I to IV detailed in the methods section (see Fig. 1 for details). hASC obtained from lipoaspirates grew as a monolayer and displayed a fibroblast-like and spindle-shaped morphology when they were cultured in DMEM-FBS (stage I, Fig. 3A). When the culture medium was replaced by DMEM without serum, the cells began to form 3-dimensional cellular aggregates (termed SCF), which increased in size over time (stage II; Fig. 3B). We obtained between 50 and 70 SCF in each T-75 tissue culture flask. When these SCF were scraped-off and seeded in SFO3 medium, SCF began to connect each other and showed a variable morphology (stage III; Fig. 3C, D). At the end of stage III were obtained $3.9 \pm 2.1 \times 10^5$ cells in each well-plate from 10–15 SCF. For the stage IV, cells scraped-off from 2 wells were seeded in a T-75 tissue culture flask. Cells displayed an elongated morphology and were arranged in parallel or grew attached surrounding the SCF (stage IV; Fig. 3E, F). At this stage the doubling time of ME-LC was shorter than hASC, 2.7 ± 0.1 days and 3.8 ± 0.3 days, respectively.

ME-LC isolated after several culture stages express markers associated to vascular progenitors coupled to a decreased expression of the mesenchymal marker CD90

Flow cytometry was carried out in each of these culture stages to assess the presence or absence of hematopoietic, endothelial, and mesenchymal markers. The expression of the hematopoietic markers CD133, CD34, CD45, KDR, and CXCR4 significantly varied throughout the isolation process (*P* < 0.05, Mann–Whitney *U*-test) (Fig. 4A). Initially, the cultures were negative for all markers during stages I and II. When the cells were cultured in SFO3 medium (stage III), they slightly upregulated these markers to a some extent: $14.1\% \pm 1.7\%$ for CD133, $18.3\% \pm 4.9\%$ for CD34, $21\% \pm 3.7\%$ for CD45, $27.3\% \pm 5.5\%$ for KDR, and $13\% \pm 1.65\%$ for CXCR4. In stage IV, when the cells had been cultured in EGM-2 medium, the expression of these markers dropped (Fig. 4A).

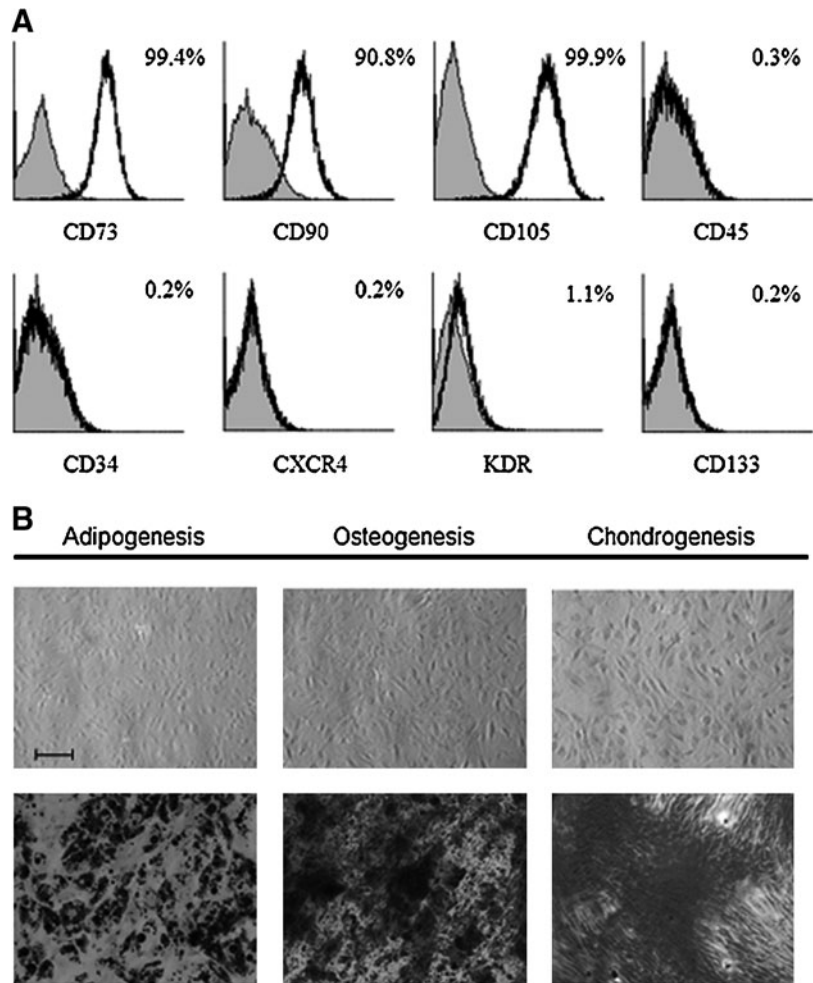


FIG. 2. Phenotypic characterization and differentiation potential of hASC. **(A)** Flow cytometry characterization of hASC. *Gray histograms* identify the isotype controls (negative). **(B)** Differentiation potential of hASC toward adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineage. Adipogenesis was confirmed by Oil Red O staining, chondrogenesis by Toluidine Blue staining, and osteogenesis by Alizarin Red S staining. *Upper pictures* show negative controls, hASCs cultured in normal medium for 2 weeks, and then histochemically stained. Scale bar = 200 μ m.

High levels of expression of the MSC markers CD105, CD73, and CD90 were observed throughout the different stages of the ME-LC isolation procedure (Fig. 4B). A Mann-Whitney *U*-test indicates significant ($P < 0.05$) differences among the expression of the 3 markers (Fig. 4B). Interestingly, CD90 expression decreased significantly in cells cultured in SFO3 medium (stage III: $41\% \pm 15.8\%$) in comparison with cells in the stage I ($94.1\% \pm 2.2\%$), stage II (80 ± 8.6), and stage IV ($87.5\% \pm 2.7\%$).

Figure 4C shows a comparison between marker expression of cells at stages I, III, and IV versus HUVEC, which were used as control of mature ECs. HUVEC and ME-LC showed expression of the progenitor markers (CXCR4 and KDR). CD133 and CD34 were found expressed in ME-LC but not in HUVEC. Expression of the MSC marker CD90 decreased in both ME-LC cultured in SFO3 and HUVEC as compared with cells at stage I. Finally, the endothelial marker CD31 was highly expressed in mature HUVEC ($63\% \pm 11.4\%$) but it was barely expressed in stages I, III, and IV (Fig. 4C). All together, these data suggest that ME-LC isolated from hASC cultures express markers resembling a vascular progenitor phenotype.

Expression levels of genes related with EPC were assessed by RT-PCR. Cells cultured from stage I to IV maintained the expression of genes such as *CD133*, *CXCR4*, *CDK2*, and *FLT1*. A weak expression of *CCR7* and

CDK2 genes was detected in cells at stage III (Fig. 4D). Expression of *TIE2* was only detected at stage I, but not in subsequent stages. Finally, expression of *DLL4* (a Notch ligand) was found highly expressed at stage I. Its expression, however, decreased at from stage II onward and was completely lost at stages III and IV (Fig. 4D). These gene expression data suggest the endothelial progenitor phenotype of ME-LC.

ME-LC enhance functional capillary-like structures formation in a Matrigel assay

As shown in Fig. 5A, cells from cultures at stage I and II were not able to form any capillaries over 7 days. On the other hand, cells previously grown in SFO3 or EGM-2 (stages III and IV, respectively) displayed a large number of capillary-like structures as early as 4 h after being seeded on MatrigelTM and the appearance of capillary-like structures increased overtime. After 7 days in culture, a well-established cellular network was present in all the cultures (Fig. 5A). As a positive control, the capability of HUVEC to form capillary-like structures in MatrigelTM was also assessed. The results showed the appearance of these capillary-like structures after 4 and 24 h in MatrigelTM. However, these structures disappeared when HUVEC were cultured for 7 days likely due to their very mature nature (Fig. 5A).

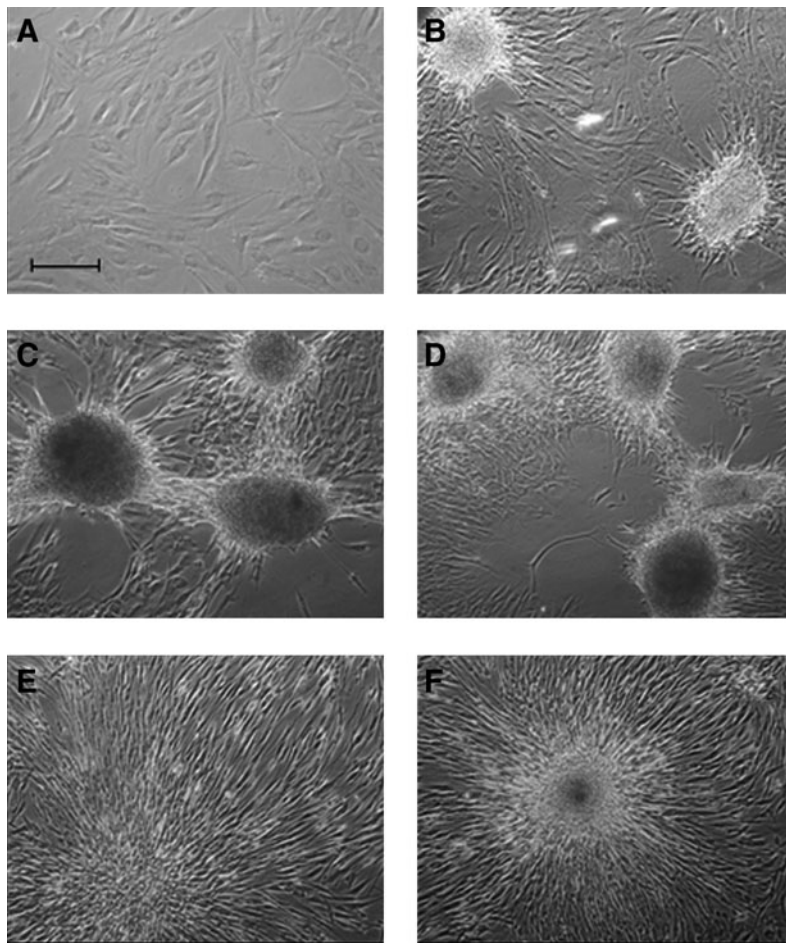


FIG. 3. Changes in cellular morphology and distribution in different culture stages. **(A)** Phase-contrast microscopy of cells cultured in DMEM-FBS (stage I). **(B)** SCF in serum-free DMEM (stage II). **(C, D)** Interconnected SCF cultured in SFO3 medium (stage III). **(E, F)** Cells cultured in collagen IV-coated flasks in EGM-2 medium (stage IV). Scale bar = 200 μm .

The number of capillary-like structures was counted in every Matrigel™-coated well after 24h of culture such as is described in the Methods section. As the hASC were cultured throughout the distinct stages they gradually gained ability to form capillary-like structures ($P < 0.05$). By stage IV, the number of capillary-like structures was similar in comparison with the data rendered by HUVEC, used as control (Fig. 5B).

Increased release of the angiogenic cytokine SDF-1 by ME-LC

The presence of the SDF-1 cytokine in the medium was analyzed by ELISA at different time points. There was a significantly increased of SDF-1 ($P < 0.05$) in supernatants harvested at stage III ($583 \pm 67 \text{ pg/mL}$) and IV ($1420 \pm 225 \text{ pg/mL}$) in comparison with the SDF-1 levels at stages I and II ($148 \pm 20 \text{ pg/mL}$ and $148 \pm 37 \text{ pg/mL}$, respectively). Moreover, when cells at stage IV were maintained for further 2 weeks in EGM-2 medium, the concentration of SDF-1 increased drastically ($4113 \pm 170 \text{ pg/mL}$) (Fig. 6A).

Finally, to determine the influence of endothelial growth factors on ME-LC included in a model of extracellular matrix, we cultured ME-LC for 2 weeks on Matrigel™-coated plates on EGM-2 medium versus EBM-2 medium supplemented with 5% FBS. The SDF-1 levels in the supernatants were $148 \pm 15 \text{ pg/mL}$ in cells cultured in EBM-2 supplemented with 5% FBS and $568 \pm 40 \text{ pg/mL}$ for cells cultured in EGM-2 (Fig. 6B).

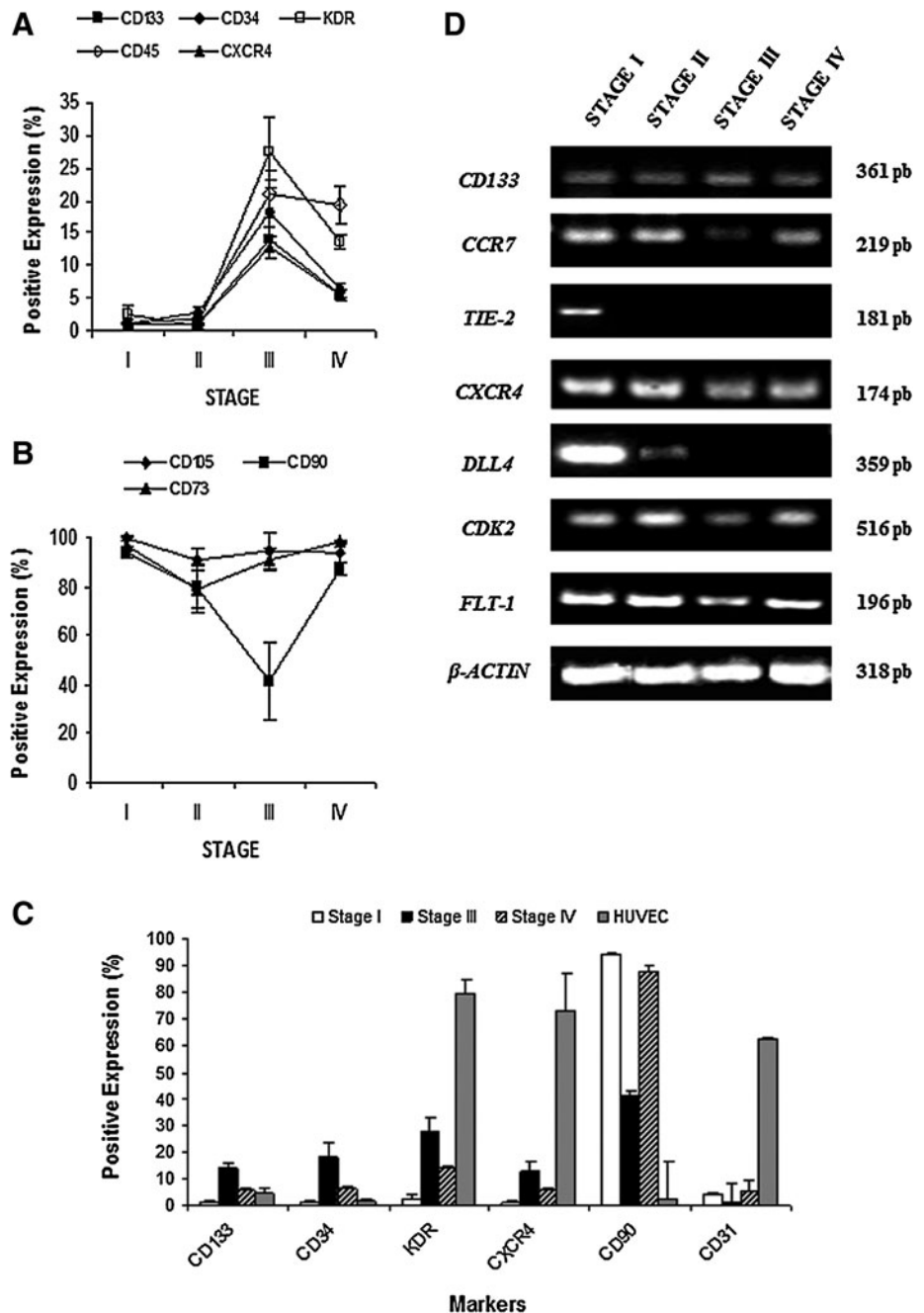
ME-LC are able to migrate in response to angiogenic cytokine stimuli

To investigate the cell migratory response of ME-LC toward different angiogenic cytokines such as SDF-1, VEGF, and HGF, we used a modified Boyden chamber with cells cultured in EBM-2 medium supplemented with 10% FBS for 12 h (Fig. 7A). SDF-1, VEGF, or HGF cytokines induced cell migration of ME-LC from the upper compartment through the pores of the membrane into the lower compartment (Fig. 7B, C). Negative controls were performed adding cytokine-free medium into the lower compartment.

ME-LC have the ability to differentiate into a cardiac phenotype

Finally, we tested the potential of the ME-LC to differentiate toward a cardiomyocyte phenotype after exposure to 5-aza [12]. Morphological changes and expression of cardiac-specific markers were determined after 3 weeks of culture. Upon 5-aza treatment, ME-LC changed their morphology. Treated ME-LC were wider and displayed branching fibers easily observed by phase-contrast microscopy (Fig. 8A). Immunocytochemistry analysis revealed the expression of typical cardiomyocyte markers such as Troponin-T, Desmin, and α -Actinin in the cytoplasm of the 5-aza-treated cells. Interestingly, these markers colocalized (Fig. 8B). Moreover, cells that stained positive for these cardiac markers showed a

FIG. 4. Fluorescence-activated cell sorting and RT-PCR analysis of endothelial, hematopoietic, and mesenchymal markers throughout ME-LC isolation stages. **(A)** hASC cultured in different media were tested for hematopoietic and endothelial markers (CD133, CD34, KDR, CD45, and CXCR4) and **(B)** mesenchymal surface markers (CD105, CD73, and CD90) by flow cytometry. **(C)** Comparative expression of surface antigens determined between HUVEC (gray bars), ME-LC cultured in EGM-2 (stage IV; striped bars) and SFO3 (stage III; black bars), and hASC cultured in DMEM-FBS (stage I; white bars) by flow cytometry. All data are expressed as mean \pm SE of 4 independent experiments performed in triplicate ($P < 0.05$). **(D)** The expression of CD133, CCR7, TIE-2, CXCR4, DLL4, CDK2, and FLT-1 was evaluated by RT-PCR in cells at different stages (I to IV) cultured in different media (DMEM-FBS; DMEM; SFO3 and EGM-2). β -actin was used as a housekeeping gene. Experiments were performed in triplicate and were carried out at least twice yielding identical results. HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; SE, standard error.



parallel and interconnected distribution with the presence of bi- and multinucleated cells. Control ME-LC nontreated with 5-aza were negative for all the cardiomyocyte markers examined (Fig. 8C).

Discussion

Cardiovascular diseases, such as the ischemic heart disease and peripheral arterial occlusive disease, cause an elevated morbidity and mortality in developed countries. Currently, several clinical trials use different strategies for cell delivery and a diverse cell sources for transplantation [6–8]. In this respect, regenerative therapy to treat endothelial tissue damage has focused on the use of autologous stem

cells, mainly EPC harvested from blood, BM, or umbilical cord blood [22]. Nevertheless, the scarcity of EPC in adult tissues makes its therapeutic use a challenge. As an alternative, the endothelial differentiation potential of MSCs has been explored by stimulating MSCs with angiogenic growth factors and it was proved that the differentiated MSCs were able to integrate into new blood vessels in vivo [23].

Recently, it has been shown that adipose tissue contains a population of adult multipotent cells with extensive proliferative capacity in vitro which are able to differentiate into several lineages, including ECs, smooth muscle cells, and cardiomyocytes [13,24,25]. In fact, there are preclinical studies supporting the capability of MSCs obtained from BM, umbilical cord blood, or adipose tissue to differentiate

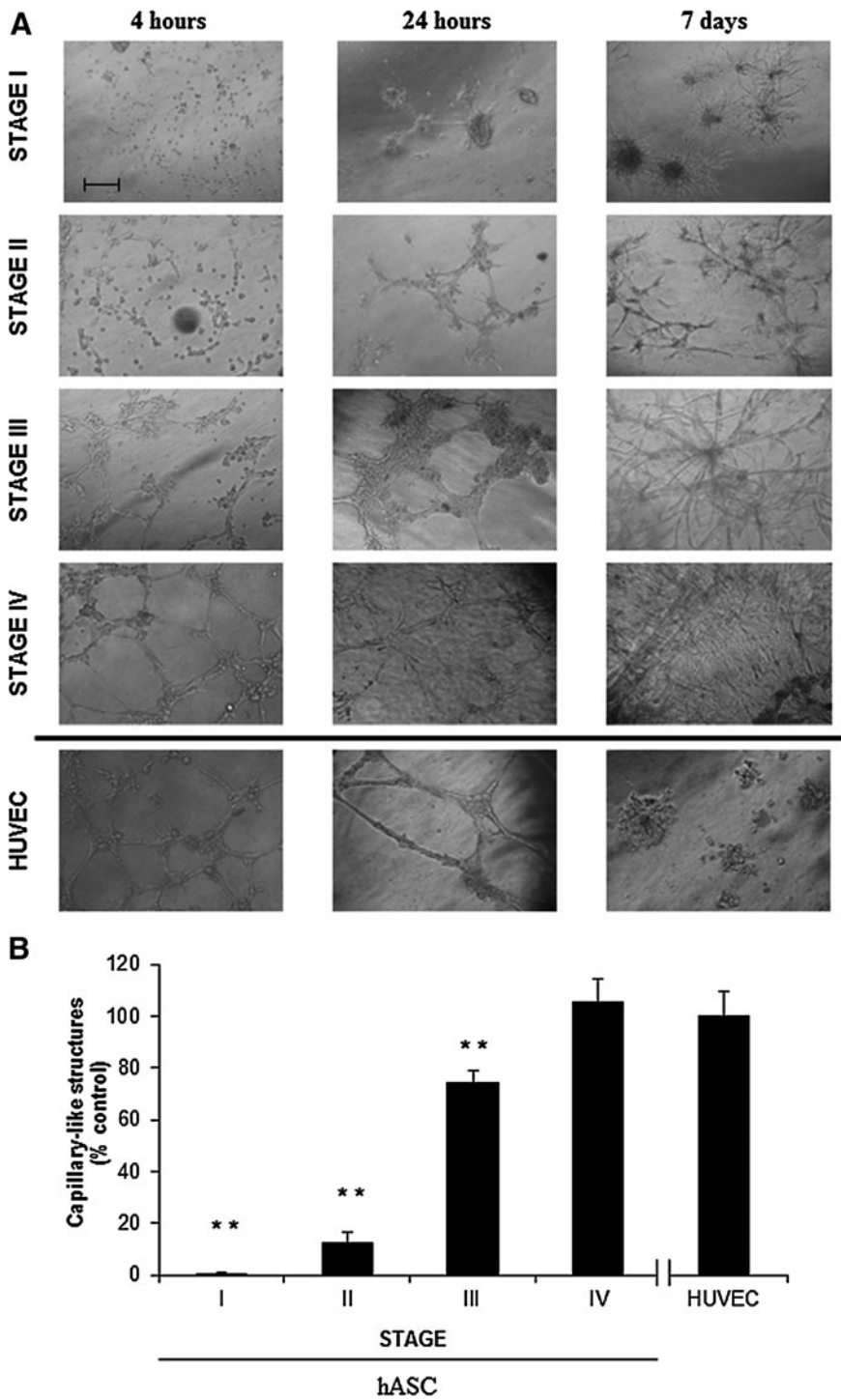


FIG. 5. Capillary network formation assay. **(A)** Representative light microscopy analysis of cells at different culture stages and HUVEC grown on Matrigel™-coated wells with EGM-2 medium. Pictures were taken at 4 h, 24 h, and 7 days of culture. Pictures from 1 representative experiment of 3 independent experiments are shown. Scale bar = 200 μm. **(B)** Semiquantification of the capillary formation index. Bars correspond to the percentage of the number of capillary-like structures comparatively to control (HUVEC) measured after 24 h of culture on Matrigel™. All data from 3 independent experiments performed in duplicate are expressed as mean ± SE (***P* < 0.05 vs. HUVEC).

into endothelial mature cells [26,27]. However, it was reported that mature ECs can proliferate in vitro although they gradually lose their proliferative potential hampering their clinical application [28]. From a therapeutic standpoint, it becomes necessary the isolation of sufficient numbers of progenitor cells capable of maintaining their angiogenic potential in vitro for long periods. Here, we present a simple and reproducible approach to maintain ME-LC isolated from subcutaneous adipose tissue. Moreover, we tried to induce cardiomyocytic differentiation to demonstrate the capacity of ME-LC to differentiate into both endothelial and cardio-

myocyte-like cells, which could have advantages in the stem cell-based cardiovascular therapy.

Phenotypic characterization of hASC isolated from lipospirates showed a high expression of mesenchymal-specific surface markers such as CD105, CD73, and CD90, and barely expressed hematopoietic stem cells (HSC) or EPC markers (CD45, CD34, CD133, CXCR4, or KDR). Moreover, hASC possessed the ability to differentiate into various lineages as previously shown [29]. hASC were cultured along several stages (stage I to IV, Fig. 1). Culture in serum-free media for 3 weeks resulted in the appearance of SCF that

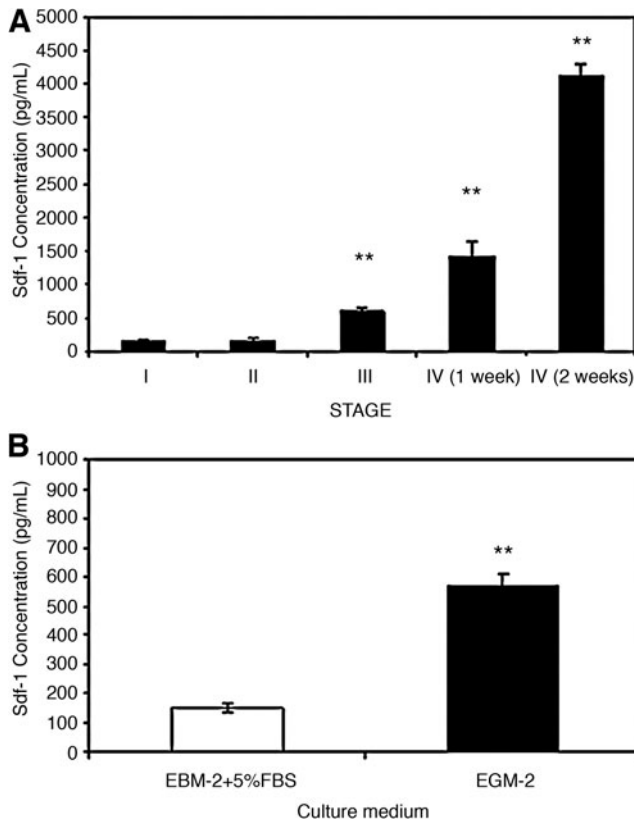


FIG. 6. SDF-1 detection in culture supernatants. **(A)** SDF-1 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the medium supernatant harvested in different culture stages. **(B)** SDF-1 concentration released by ME-LC cultured on Matrigel-coated plates grown on EGM-2 medium versus EBM-2 medium supplemented with 5% FBS. All data are expressed as mean \pm SE of 4 independent experiments performed in duplicate (** $P < 0.05$). EBM-2, endothelial basal medium-2; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; EGM-2, endothelial growth medium.

increased in number and size throughout the subsequent culture stages. Previously, Hirashima et al. [15] demonstrated that a chemically defined serum-free culture system, including 2-mercaptoethanol, had the ability to support the proliferation of ECs and their progenitors from mesoderm cells. When cells were cultured in SFO3 medium (stage III) and in EC medium (EGM-2; stage IV), both termed ME-LC, increased their expression of EPC and hematopoietic markers (CD34, CD133, KDR, CXCR4, and CD45) [30]. The coexistence of hematopoietic and endothelial markers in the ME-LC is indicative of a phenotype resembling early vascular progenitors since it has been reported the existence of a bipotent precursor cell, termed the hemangioblast, capable of giving rise to both hematopoiesis and vascular endothelium [31]. In contrast, mature ECs HUVEC were negative for CD34 and CD133 progenitor markers and strongly positive for CD31, a mature endothelial marker. These antigens (CD34 and CD133) are lost upon differentiation of endothelial progenitors to endothelium [30]. CD34 expression in hASC is correlated with replicative capacity, differentiation potentials, expression profiles of angiogenesis-related genes, and immaturity or stemness of these cells [32]. Similar results were obtained by Howson et al. [33] using postnatal aorta to

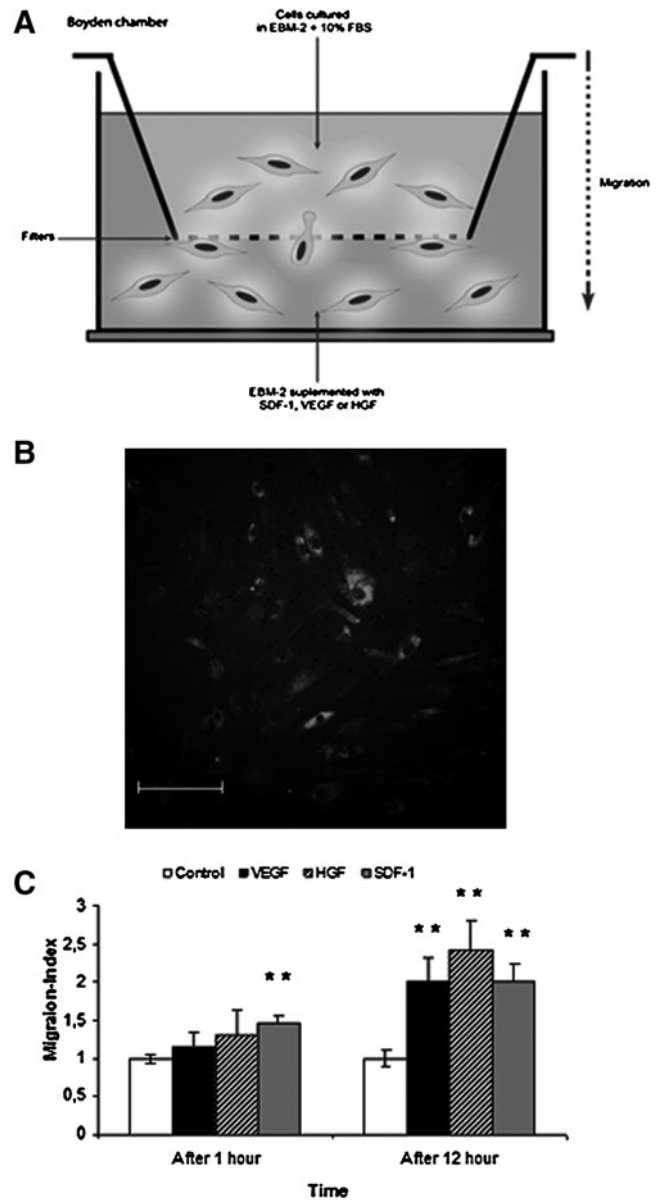


FIG. 7. Migration capacity of ME-LC. **(A)** Illustrative cartoon of the modified Boyden chamber experiment. **(B)** Confocal microscopy image of calcein AM-labeled cells that migrated through the filter using SDF-1 as chemoattractive cytokine after 12 h. Scale bar = 100 μ m. **(C)** Migratory effect of SDF-1, VEGF, and hematopoietic growth factor cytokines in ME-LC after 1 and 12 h. The migration index was estimated dividing fluorescence data of ME-LC migration toward different cytokines respect to the control, which represent ME-LC migration when cytokine-free medium was added into the lower compartment. All data are expressed as mean \pm SE of 3 independent experiments performed in triplicate (** $P < 0.05$ vs. the control group).

develop culture conditions for the isolation of nonendothelial mesenchymal cells with long-term maintenance in an undifferentiated state. Under serum-free conditions vascular progenitor cells obtained were CD34⁺/CD31⁻, grew forming spheroids, and were identified as pericyte progenitor cells [33]. However, another study showed that using the same serum-free media, cells obtained from lipospires

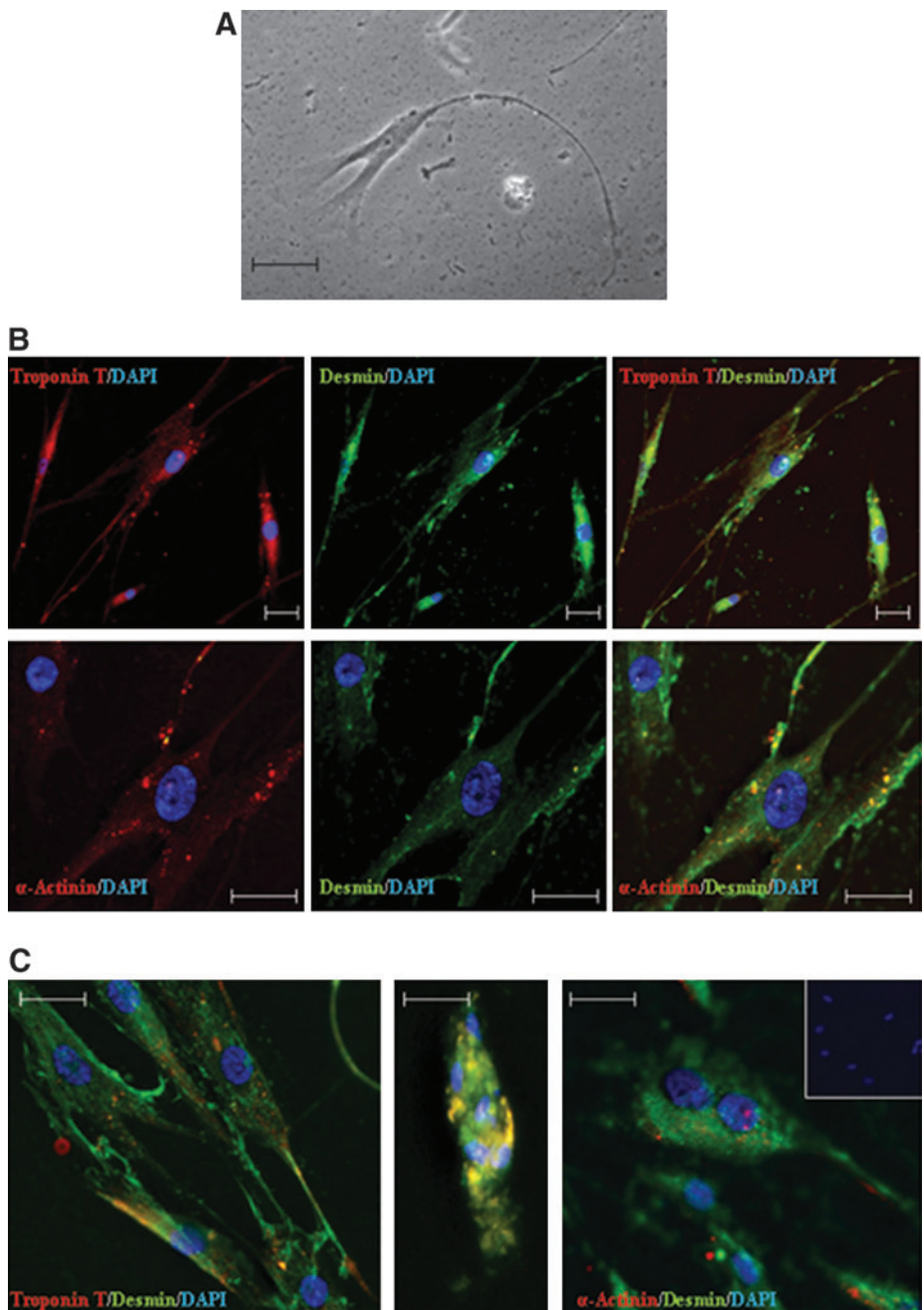


FIG. 8. Cardiomyocyte differentiation potential of ME-LC. **(A)** Phase-contrast microscopy of ME-LC treated with 10 μ M of 5-azacytidine for 24h and then cultured in EGM-2 for 3 weeks. Image shows a cell with an increased size and the presence of branching fibers that are characteristics of myotube-like cells. Scale bar=100 μ m. **(B)** Immunofluorescence staining for the expression of cardiac markers in cells cultured in EGM-2 for 3 weeks after induction with 5-azacytidine. *Top panels* show the cytoplasmatic expression of Troponin-T-TRICT (*red*) and Desmin-FITC (*green*) in treated cells. Scale bar=50 μ m. *Bottom panels* show a double staining with the cardiac markers α -Actinin-TRICT (*red*) and Desmin-FITC (*green*), which colocalized in the cytoplasm. Scale bar=50 μ m. **(C)** Parallel and interconnected distribution of cardiomyocyte-like cells stained with different antibodies displaying the presence of bi and multinucleated cells. The small picture in the upper right corner represents the negative control. Nuclei are stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (*blue*). Scale bar=50 μ m.

had increased proportion of Flk-1+ (KDR) marker and were negative for CD34, CD45, and CD133. When these cells were seeded in EC differentiation medium for 3 days, the expression of Flk-1+ decreased over time, whereas the expression of mature EC markers increased [27]. In contrast to our study, they cultured the cells during shorter period in serum-free media and in EC medium, likely accelerating endothelial maturation due to serum components, which have been proved to induce cell maturation [34].

Interestingly, both ME-LC and HUVEC expressed high levels of CXCR4 and KDR. Phenotypically, MSCs are identified by the absence of CD45, CD34, and other hematopoietic-associated markers [3]. In addition, the MSC marker CD90, whose expression was practically absent in HUVEC, was the

marker whose expression most significantly decreased when ME-LC were cultured in SOF3 medium (stage III), suggesting endothelial differentiation. In agreement, it has been shown an annihilation of CD90 antigen expression on mesenchymal stromal cells by angiogenic stimulation in vitro [35].

In contrast, CD90-positive cells recovered at stage IV in which cells reached a high rate of proliferation. It has been shown that the expression of CD90 on EPC and pericytes may be indicative of their angiogenic potential and capacity for proliferation [36].

Gene expression profile confirmed the endothelial progenitor phenotype with the expression and maintenance of specific genes involved in self-renewal, cell cycle promotion,

and antiapoptotic such as has been recently showed in cord blood-derived EPC [5]. Both CXCR4 and CD133 vascular genes were expressed at similar levels throughout the distinct culture stages. Nevertheless, genes expressed in differentiated EPC such as *Cdk2* and *Flt-1* [5] showed a weak expression level in ME-LC cultured in SOF3 medium. Another interesting result was the disappearance of *Tie-2* gene expression, which has been previously reported as angiogenic factor clearly induced in the differentiated ECs [37]. Constitutive Ang1–Tie2 signaling is thought to maintain the quiescent endothelial phenotype in vivo [38]. In addition to ECs, Tie2 is expressed in a subpopulation of HSC being, in part, responsible of maintaining a quiescent state in the BM niche [39]. Also, our results showed that the expression of the Notch ligand, delta-like 4 (DLL4), was downregulated in ME-LC, which correlated with the early formation of large number of capillary-like structures and the late formation of a vascular network. Recent studies have demonstrated that DLL4 limits the angiogenic potential in developing blood vessels and the loss of DLL4 results in an arterial hyperbranching phenotype [40]. Interestingly, in contrast to HUVEC, only ME-LC cultured in SFO3 (stage III) and EGM-2 (stage IV) media were able to strongly enhance capillary tubes formation after 7 days. It has been shown that VEGF stimulation of HUVEC induces Dll4 expression, which reduced vessel sprout length in a 3D tubulogenesis assay, confirming that DLL4 signaling inhibits angiogenesis. DLL4 expression seems to acts as a switch blocking EC proliferation and allowing induction of a more mature differentiated phenotype [41].

Several studies have identified several molecules such as VEGF and SDF-1 as key regulators of the proliferation, chemotaxis toward ischemic tissues, and differentiation of EPC [42]. hASC secrete multiple potentially synergistic proangiogenic growth factors, including VEGF, HGF, and chemokine SDF-1, which are likely to play a pivotal role for the hASC-mediated angiogenesis [43]. In fact, SDF-1 has been shown to enhance neovascularization by accelerating EPC recruitment into ischemic foci [42]. In our study, ME-LC showed an increased secretion of SDF-1 in comparison with hASC, even when they were seeded into Matrigel™. In addition, the role of SDF-1 to induce migration of CD133+/CD34+/KDR+ cells has been shown [30]. In the present study, we demonstrate how the ME-LC, which express the SDF-1 receptor, CXCR4, were able to migrate toward an SDF-1 gradient. These data suggest the potential homing of ME-LC to sites of vascular injury for tissue repair.

Most importantly, we show that after exposure to 5-azacytidine ME-LC retained the capacity to differentiate into cardiomyocyte-like cells with the acquisition of a cardiogenic phenotype and the expression of cardiomyocyte-specific markers. Morphological changes consisted of the appearance of wide, branching, and multinucleated cells resembling cardiac muscle cells [44]. The expression of cardiomyocyte markers such as troponin-T and α -sarcomericactinin [44] and the presence of a desmin filaments network, which take part in regulating the mesodermal specification into cardiomyocytes [45], support the cardiomyocyte differentiation from ME-LC.

In summary, our studies indicate that subcutaneous adipose tissue may be a useful source of autologous ME-LC with the capacity to maintain their vascular progenitor properties. The culture method described in the present

study may be used to isolate, maintain, and propagate these cells with an increased expression of specific endothelial progenitor markers. This methodology could be applied to MSCs from other origins such as BM-derived stromal/stem cells. However, the interest of our study was the use of hASC isolated from liposuction, which is a less invasive method than BM aspiration and allows the collection of a high rate of progenitor cells. This can overcome the limited proliferation potential of mature ECs and EPC, which hampers their clinical use. ME-LC increased the secretion of SDF-1, formed vascular-like structures, and displayed the ability to migrate toward a cytokine gradient. Moreover, ME-LC retained the capacity to differentiate into cardiomyocyte-like cells, showing expression of typical cardiomyocyte markers. This property suggests the potential of ME-LC to recellularize damaged tissue or strengthen the post-infarct scar as well as inducing neovascularization of the affected area, which could have advantages in the stem cell-based cardiovascular therapy. It has been demonstrated the ability of cardiac stem cells to differentiate into the ECs, contributing to neovascularization in the process of tissue remodeling and/or regeneration [46]. Furthermore, recent studies showed interest in the cardiac and endothelial capacity of stem cell, providing important tools for the study of differentiation in vitro and future stem cell therapy for ischemic cardiomyopathy [47,48]. Future studies should explore further the functional in vitro and in vivo mechanisms of ME-LC in cardiovascular diseases along with their potential therapeutic impact, and our experimental data suggest that these cells may prove to be a valuable tool for vascular and cardiac repair.

Funding

This work was supported in part by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria grant number PI10/02295), the Consejería de Salud (Junta de Andalucía grant number PI-0384/2008), the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (Junta de Andalucía excellence project number CTS-6568) and the University of Granada (GREIB translational project number GREIB.PT_2010_09). Research in P.M.'s Lab was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (grant number PI070026), Ministry of Science and Innovation (MICINN; grant number PLE-2009-0111), and by the Junta de Andalucía (grant number CICE-P08-CTS-3678). C.B. is supported by the ISCIII-FIS (grant number CP07/00059).

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Manuela Expósito from FI-BAO for excellent technical assistance with statistical studies. We also thank Emma Gutierrez González for helping in the artwork.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Asahara T, T Murohara, A Sullivan, M Silver, R van der Zee, T Li, B Witzenbichler, G Schatteman and JM Isner. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964–967.

2. S Kim and von Recum H. (2008). Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application. *Tissue Eng Part B Rev* 14:133–147.
3. Campioni D, A Lo Monaco, F Lanza, S Moretti, L Ferrari, M Fotinidi, R La Corte, A Cuneo and F Trotta. (2008). CXCR4 positive circulating progenitor cells coexpressing monocytic and endothelial markers correlating with fibrotic clinical features are present in the peripheral blood of patients affected by systemic sclerosis. *Haematologica* 93:1233–1237.
4. Krenning G, BW van der Strate, M Schipper, XJ van Seijen, BC Fernandes, MJ van Luyn and MC Harmsen. (2009). CD34+ cells augment endothelial cell differentiation of CD14+ endothelial progenitor cells *in vitro*. *J Cell Mol Med* 13:2521–2533.
5. Igreja C, R Fragoso, F Caiado, N Clode, A Henriques, L Camargo, EM Reis and S Dias. (2008). Detailed molecular characterization of cord blood-derived endothelial progenitors. *Exp Hematol* 36:193–203.
6. Taljaard M, MR Ward, MJ Kutryk, DW Courtman, NJ Camack, SG Goodman, TG Parker, AJ Dick, J Galipeau and DJ Stewart. (2010). Rationale and design of Enhanced Angiogenic Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction (ENACT-AMI): the first randomized placebo-controlled trial of enhanced progenitor cell therapy for acute myocardial infarction. *Am Heart J* 159:354–360.
7. Tateishi-Yuyama E, H Matsubara, T Murohara, U Ikeda, S Shintani, H Masaki, K Amano, Y Kishimoto, K Yoshimoto, H Akashi, K Shimada, T Iwasaka and T Imaizumi. Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360:427–435.
8. Dzau VJ, M Gnecci, AS Pachori, F Morello and LG Melo. (2005). Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *Hypertension* 46:7–18.
9. Iwashima S, T Ozaki, S Maruyama, Y Saka, M Kobori, K Omae, H Yamaguchi, T Niimi, K Toriyama, Y Kamei, S Torii, T Murohara, Y Yuzawa, Y Kitagawa and S Matsuo. (2009). Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev* 18:533–543.
10. Foresta C, L De Toni, A Ferlin and A Di Mambro. (2010). Clinical implication of endothelial progenitor cells. *Expert Rev Mol Diagn* 10:89–105.
11. Jin XB, YS Sun, K Zhang, J Wang, XD Ju and SQ Lou. (2007). Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells *in vivo*. *Acta Pharmacol Sin* 28:663–671.
12. Rodríguez-Serrano F, P Alvarez, O Caba, M Picón, JA Marchal, M Perán, J Prados, C Melguizo, AR Rama, H Boulaiz and A Aránega. (2010). Promotion of human adipose-derived stem cell proliferation mediated by exogenous nucleosides. *Cell Biol Int* 34:917–924.
13. Perán M, JA Marchal, E López, M Jiménez-Navarro, H Boulaiz, F Rodríguez-Serrano, E Carrillo, G Sánchez-Espin, E de Teresa, D Tosh and A Aranega. (2010). Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes. *Cytotherapy* 12:332–337.
14. Rubio R, J García-Castro, I Gutiérrez-Aranda, J Paramio, M Santos, P Catalina, PE Leone, P Menendez and R Rodríguez. (2010). Deficiency in p53 but not retinoblastoma induces the transformation of mesenchymal stem cells *in vitro* and initiates leiomyosarcoma *in vivo*. *Cancer Res* 70:4185–4194.
15. Hirashima M, M Ogawa, S Nishikawa, K Matsumura, K Kawasaki, M Shibuya and S Nishikawa. (2003). A chemically defined culture of VEGFR2+ cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells. *Blood* 101:2261–2267.
16. Menéndez P, JA Pérez-Simón, MV Mateos, MD Caballero, M González, San-Miguel JF and A Orfao. (2002). Influence of the different CD34+ and CD34- cell subsets infused on clinical outcome after non-myeloablative allogeneic peripheral blood transplantation from human leucocyte antigen-identical sibling donors. *Br J Haematol* 119:135–143.
17. Montes R, G Ligeró, L Sanchez, P Catalina, T de la Cueva, A Nieto, GJ Melen, R Rubio, J García-Castro, C Bueno and P Menendez. (2009). Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF-beta and IGF-II. *Cell Res* 19:698–709.
18. Ramos-Mejia V, GJ Melen, L Sanchez, Gutierrez-Aranda I, G Ligeró, JL Cortes, PJ Real, C Bueno and P Menendez. (2010). Nodal/activin signaling predicts human pluripotent stem cell lines prone to differentiate toward the hematopoietic lineage. *Mol Ther* DOI:10.1038/mt.2010.179
19. Catalina P, C Bueno, R Montes, A Nieto, G Ligeró, L Sanchez, M Jara, A Rasillo, A Orfao, J Cigudosa, O Hovatta, M Greaves and P Menendez. (2009). Genetic stability of human embryonic stem cells: A first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia. *Leuk Res* 33:980–990.
20. Soares R, G Balogh, S Guo, F Gartner, J Russo and F Schmitt. (2004). Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. *Mol Endocrinol* 18:2333–2343.
21. Lopes FC, A Rocha, A Pirraco, LO Regasini, DH Silva, VS Bolzani, I Azevedo, IZ Carlos and R Soares. (2009). Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *BMC Complement Altern Med* 9:15.
22. Ingram DA, LE Mead, H Tanaka, V Meade, A Fenoglio, K Mortell, K Pollok, MJ Ferkowicz, D Gilley and MC Yoder. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104:2752–2760.
23. Dai W, SL Hale, BJ Martin, JQ Kuang, JS Dow, LE Wold and RA Kloner. (2005). Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 112:214–223.
24. Madonna R and R De Caterina. (2010). Adipose tissue: a new source for cardiovascular repair. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 11:71–80.
25. Bayes-Genis A, C Soler-Botija, J Farré, P Sepúlveda, A Raya, S Roura, C Prat-Vidal, C Gálvez-Montón, JA Montero, D Büscher and JC Belmonte. (2010). Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. *J Mol Cell Cardiol* 49:771–780.
26. Chen MY, PC Lie, ZL Li and X Wei. (2009). Endothelial differentiation of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells 7:629–640.
27. Martínez-Estrada OM, Y Muñoz-Santos, J Julve, M Reina and S Vilaró. (2005). Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res* 65:328–333.
28. Prasad Chennazhy K and LK Krishnan. (2005). Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials* 26:5658–5667.

29. Marchal JA, H Boulaiz, M Peran, J Prados, J Campos, F González, F Rodríguez-Serrano, C Melguizo, C Vélez, E Carrillo, F Hita, R Ortiz, A Martínez-Amat, O Caba, C Ventura and A Aránega. Eds. (2009). *Therapeutic Potential of Differentiation in Cancer and Normal Stem Cells*. Nova Science Publishers, Inc., New York.
30. Peichev M, AJ Naiyer, D Pereira, Z Zhu, WJ Lane, M Williams, MC Oz, DJ Hicklin, L Witte, MA Moore and S Rafii. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952–958.
31. Wang L, Li L, F Shojaei, C Cerdan, P Menendez, T Martin, A Rouleau and M Bhatia. (2004). Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 21:31–41.
32. Suga H, D Matsumoto, H Eto, K Inoue, N Aoi, H Kato, J Araki and K Yoshimura. (2009). Functional Implications of CD34 Expression in Human Adipose-Derived Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Dev* 18:1201–1210.
33. Howson KM, AC Aplin, M Gelati, G Alessandri, Parati EA and RF Nicosia. (2005). The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:1396–1407.
34. Landerholm TE, XR Dong, J Lu, NS Belaguli, RJ Schwartz and MW Majesky. (1999). A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells. *Development* 126:2053–2062.
35. Campioni D, F Lanza, S Moretti, L Ferrari and A Cuneo. (2008). Loss of Thy-1 (CD90) antigen expression on mesenchymal stromal cells from hematologic malignancies is induced by *in vitro* angiogenic stimuli and is associated with peculiar functional and phenotypic characteristics. *Cytotherapy* 10:69–82.
36. Bagley RB, W Weber, C Rouleau and BA Teicher. (2005). Pericytes and Endothelial Precursor Cells: Cellular Interactions and Contributions to Malignancy. *Cancer Res* 65:9741–9750.
37. Furuhata S, K Ando, M Oki, K Aoki, S Ohnishi, K Aoyagi, H Sasaki, H Sakamoto, T Yoshida and S Ohnami. (2007). Gene expression profiles of endothelial progenitor cells by oligonucleotide microarray analysis. *Mol Cell Biochem* 298:125–138.
38. Saharinen P, M Bry and K Alitalo. (2010). How do angiopoietins Tie in with vascular endothelial growth factors? *Curr Opin Hematol* 17:198–205.
39. Gomei Y, Y Nakamura, H Yoshihara, K Hosokawa, H Iwasaki, T Suda and F Arai. (2010). Functional differences between two Tie2 ligands, angiopoietin-1 and -2, in regulation of adult bone marrow hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 38:82–89.
40. Hogan BM, R Herpers, M Witte, H Heloterä, K Alitalo, HJ Duckers and Schulte-Merker S. (2009). *Vegfc/Flt4* signalling is suppressed by Dll4 in developing zebra fish intersegmental arteries. *Development* 136:4001–4009.
41. Harrington LS, RC Sainson, CK Williams, JM Taylor, W Shi, JL Li and AL Harris. (2008). Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 75:144–154.
42. Yamaguchi J, KF Kusano, O Masuo, A Kawamoto, M Silver, S Murasawa, M Bosch-Marce, H Masuda, DW Losordo, JM Isner and T Asahara. (2003). Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107:1322–1328.
43. Kondo K, S Shintani, R Shibata, H Murakami, R Murakami, M Imaizumi, Y Kitagawa and T Murohara. (2009). Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:61–66.
44. Makino S, K Fukuda, S Miyoshi, F Konishi, H Kodama, J Pan, M Sano, T Takahashi, S Hori, H Abe, J Hata, A Umezawa and S Ogawa. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103:697–705.
45. Höllrigl A, M Hofner, M Sary and G Weitzer. (2007). Differentiation of cardiomyocytes requires functional serine residues within the amino-terminal domain of desmin. *Differentiation* 75:616–626.
46. Mohri T, Y Fujio, M Maeda, T Ito, T Iwakura, Y Oshima, Y Uozumi, M Segawa, H Yamamoto, T Kishimoto and J Azuma. (2006). Leukemia inhibitory factor induces endothelial differentiation in cardiac stem cells. *J Biol Chem* 281:6442–6447.
47. Li SC, J Acevedo, PH Schwartz, L Wang, H Jiang, J Luo, RG Pestell, WG Loudon and AC Chang. (2011). Mechanisms for progenitor cell-mediated repair for ischemic heart injury. *Curr Stem Cell Res Ther* PMID:21466480
48. Choi SC, WJ Shim and DS Lim. (2008). Specific monitoring of cardiomyogenic and endothelial differentiation by dual promoter-driven reporter systems in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 30:835–843.

Address correspondence to:

Dr. Juan A. Marchal

Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER)

Centro de Investigación Biomédica

Universidad de Granada

18100 Granada

Spain

E-mail: jmarchal@ugr.es

Received for publication February 15, 2011

Accepted after revision May 3, 2011

Prepublished on Liebert Instant Online May 4, 2011