

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Renato Nieto Aguilar
D.L.: GR 3006-2010
ISBN: 978-84-693-2587-2



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Histología

Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS - 115

**“INGENIERÍA DE TEJIDOS ORO-FACIALES ELABORADOS POR
TRANSDIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES
HUMANAS”**

Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada, en el contexto del programa oficial de postgrado Máster y Doctorado en Ingeniería Tisular y fue financiado por PROMEP, recurso concedido por la Secretaría de Educación Pública en México a través de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en el siguiente artículo científico:

Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells (ASCs) in a novel fibrin-agarose scaffold. Nieto-Aguilar R., Serrato D., Garzón I., Campos A., Alaminos M. Journal of Biomaterials Applications [en prensa].

Granada, 18 de febrero de 2010.

**INGENIERÍA DE TEJIDOS ORO-FACIALES ELABORADOS POR
TRANSDIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES
HUMANAS**

Memoria que presenta el Licenciado en Odontología
Renato Nieto Aguilar
para aspirar al título de Doctor

Fdo.: Renato Nieto Aguilar

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. D. Antonio Campos Muñoz
Catedrático de Histología
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. D. Miguel Alaminos Mingorance
Profesor Titular de Histología
Universidad de Granada

VºBº El Director de la Tesis

Fdo.: Dra. D^a. María del Carmen Sánchez Quevedo
Catedrática de Histología
Universidad de Granada

Departamento de Histología
Universidad de Granada
2010

A Dios, por todas sus bendiciones

AGRADECIMIENTOS

Mi respeto y admiración para mis directores de tesis, Profesor Dr. Antonio Campos Muñoz, Profesor Dr. Miguel Alaminos Mingorance y Profesora Dra. María del Carmen Sánchez Quevedo; vosotros compartes cualidades humanas que han sensibilizado enormemente para bien los aspectos más importantes en mi vida: la voluntad, la libertad y la inteligencia.

Deya y Mateo, mi familia pequeña, vuestro apoyo y alegría son imprescindibles en mi vida. Gracias por acompañarme en todo momento.

Pá, má y miliki, mi familia grande, gracias por abrazarme y dejarme ir *con tranquilidad* a realizar mis proyectos. Gracias por realizar ininterrumpidamente todos mis encargos.

A mis compañeros e instructores en el laboratorio, Profesora Dra. Ingrid J. Garzón, Miguel González, Profesora Dra. Olga Roda, Dra. Imaculdada Cabello, Celeste Ximenez, Profesor Dr. Ismael A. Rodríguez y V. Sebastian Carriel. Todos vosotros han impulsado en una u otra forma mi desempeño y rendimiento en éste, nuestro querido laboratorio.

Afectuosamente, quiero expresar mi agradecimiento a todos los miembros del departamento de histología y a todos los miembros del grupo de investigación en ingeniería tisular. A mi familia y a mí nos han hecho sentir como en casa.

También quiero agradecer la disposición de los residentes, José María, Eduardo, Alvaro, Paco y Francis, por abastecerme con las muestras tisulares tan necesarias, para la realización de muchos de los experimentos en este trabajo Doctoral.

La realización de la presente Tesis Doctoral no hubiese sido posible sin la valiosa colaboración y la buena voluntad de españoles y mexicanos, Miguel Tapia, Miguel Castillo, Miguel Díaz, Miguel A. Ochoa, Miguel A. Aguilar, Rodrigo Guerrero y Silvia Ma. C. Figueroa. A cada uno de vosotros le debo en mucho, la culminación de este proyecto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. La ingeniería tisular	3
1.1. Células troncales	4
1.2. Biomateriales	12
1.3 Factores de crecimiento	15
2. Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs)	16
2.1. Tejido adiposo.....	16
2.2. ASCs	19
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Muestras de tejido humano	25
2. Generación de cultivos primarios de ASCs	26
3. Generación de hidrogeles de fibrina-agarosa con ASCs inmersas (HFA-Tdm).....	28
4. Inducción de los cultivos celulares de ASCs bidimensionales (CCA-Bdm) y HFA-Tdm para la transdiferenciación a los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y neurogénico	29
5. Análisis histológico	31
6. Inmunofluorescencia	32
7. Análisis de expresión génica de los cultivos celulares.....	35
RESULTADOS	38
1. Aislamiento y expansión de ASCs	39
2. Inducción a la estirpe osteogénica	40
3. Inducción a la estirpe condrogénica.....	43
4. Inducción a la estirpe adipogénica	46
5. Inducción a la estirpe neurogénica.....	49

6. Análisis de expresión génica mediante <i>microarrays</i>	54
DISCUSIÓN.....	60
CONCLUSIONES.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

INTRODUCCIÓN

Los tejidos esqueléticos (tejido óseo y tejido cartilaginoso), tejido adiposo celular subcutáneo y el tejido nervioso, constituyen variedades de tejidos muy frecuentemente afectados en las lesiones traumatológicas de la región maxilofacial (Bruder y Fox, 1999; Holcomb y Gentile, 2005; Housman *et al.*, 2008).

El tratamiento de dicha patología requiere fundamentalmente una reparación anatómica, fisiológica y en su caso estética, lo que exige la disponibilidad de un tejido capaz de sustituir eficazmente los elementos y estructuras lesionados. Para dicha sustitución se han utilizado injertos de tejidos **heterólogos** y **autólogos** si bien por las complicaciones que generan los primeros, la utilización de tejido *autólogo*, se ha generalizado (Chiu, 2008). El desarrollo reciente de la medicina regenerativa intenta elaborar mediante **ingeniería tisular** sustitutos biológicos eficaces de dichos tejidos.

A tal efecto se han desarrollado distintos modelos de *tejidos artificiales* con resultados dispares en relación con su capacidad sustitutiva y posible eficacia clínica (Priya *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2009).

En la presente tesis doctoral desarrollamos un modelo polivalente capaz de satisfacer la demanda de dichos tejidos a partir de una misma estirpe celular, lo que facilita la resolución de algunos de los problemas que plantean las técnicas quirúrgicas tradicionales y actuales disponibles en el momento presente.

En la introducción de la presente tesis doctoral describiremos en sendos apartados el concepto de **ingeniería tisular** y el concepto de **células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs)**, que constituye el elemento celular a partir del cual desarrollamos la investigación que se realiza en la presente tesis doctoral.

Una vez establecidos los objetivos, describiremos posteriormente el material y los métodos utilizados y los resultados obtenidos. Tras discutir los resultados alcanzados en el contexto bibliográfico existente enumeraremos nuestras conclusiones.

1. LA INGENIERÍA TISULAR

El término *ingeniería tisular* ha sido **definido** por la *Nacional Science Foundation* como “La aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de la relación entre estructura y función de tejidos normales y patológicos para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la actividad de los tejidos u órganos perdidos o dañados” (Vacanti y Mikos, 1995).

La indudable capacidad de la *ingeniería tisular* para regenerar tejidos del propio paciente a partir de células extraídas del mismo (Caplan, 1991; Thomson *et al.*, 1998; Bianco *et al.*, 1999), convierte a esta disciplina en una de las de mayor potencialidad dentro del campo de la *medicina regenerativa* y a una de las que han experimentado mayores tasas de progreso en años recientes (Atala, 2008).

De esta manera, la *ingeniería tisular* se nos presenta como un campo en rápido crecimiento que posiblemente representa el prototipo de los futuros desarrollos científicos. En primer lugar su multidisciplinariedad y su continua expansión durante la última década, hace de esta disciplina emergente, uno de los campos de inversión más importantes en lo que se refiere a investigación básica (Campos, 2004). De este modo, Estados Unidos y Japón han aumentado sus inversiones en el desarrollo comercial e industrial de la *ingeniería tisular*, con una tendencia claramente progresiva en lo que se refiere al desarrollo de la investigación en este campo (Sugawara y Hata, 2008).

Para generar nuevos tejidos, esto es tejidos que se denominan artificiales, la *ingeniería tisular* **emplea** tres elementos básicos: **células** con capacidad de replicación, **matrices extracelulares** o **biomateriales** y **factores de crecimiento**. Las *células* sintetizan proteínas necesarias para el desarrollo de la matriz extracelular

mientras que la *matriz extracelular* proporciona un ambiente adecuado para la proliferación de las células. Finalmente, la función de los *factores de crecimiento* es facilitar y promover la regeneración del nuevo tejido. A continuación describiremos sucesivamente estos tres componentes:

1.1. CÉLULAS TRONCALES

Por **definición** las células troncales *presentan una división mitótica de tipo asimétrico y prolongada* (Figura 1).

Según Ugarte, las principales **características de las células troncales** son (De Ugarte *et al.*, 2003):

- Tener un **potencial de regeneración** adecuado
- Ser capaces de **auto-renovarse**
- Ser **inmunocompatibles**

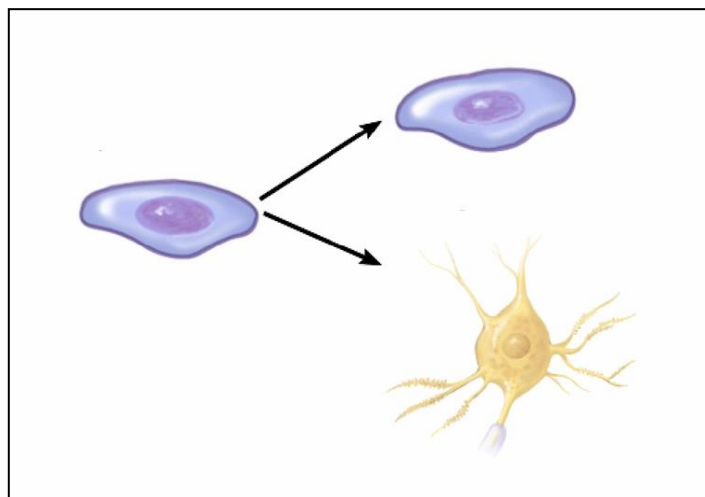


Fig. 1. Las células troncales como definición presentan una reproducción celular de tipo asimétrico. La célula troncal origina una célula semejante de reemplazo y otra que sustituirá a la célula afectada del tejido dañado.

Las células troncales se pueden clasificar atendiendo a dos criterios: **potencialidad** y **origen** (Montalvo, 2008):

1.1.1. Potencialidad, es decir, en relación a su capacidad para *diferenciarse* en distintos tipos celulares (Smith, 2006):

- **Totipotenciales**:

Son aquéllas capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario (por ejemplo: sistema nervioso, músculo, etc.) como en tejido extraembrionario (placenta y anejos placentarios). En sentido estricto, solamente los estadios iniciales del desarrollo (zigoto, blastómeras y células de la mórula) constituirían *células madre totipotenciales* (Figura 2).

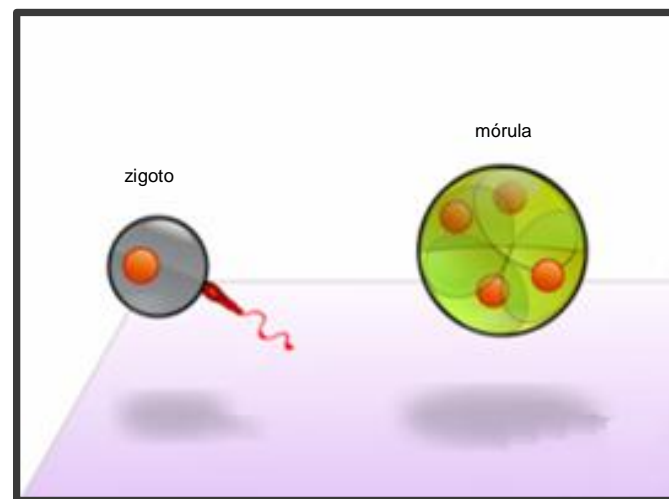


Figura 2. Células totipotenciales.

- **Pluripotenciales:**

Son aquéllas que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de los tejidos existentes en un organismo adulto, y por tanto, a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), incluyendo las células germinales. Las células *pluripotenciales* son las del polo embrionario del blastocisto (Figura 3).

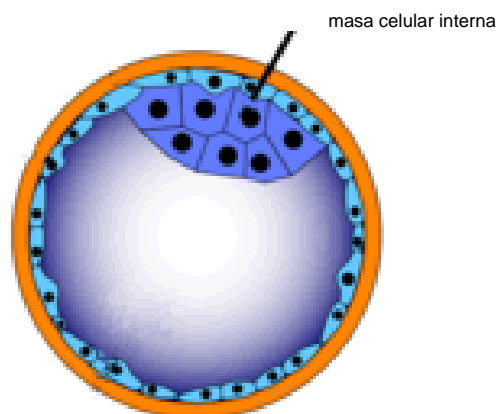


Figura 3. Células pluripotenciales (masa interna del blastocisto).

- **Multipotenciales:**

Son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencialidad a tejidos derivados de una misma capa embrionaria, es decir, tejidos derivados del ectodermo, mesodermo o endodermo. En el organismo adulto y en el feto existen numerosos tipos de *células multipotenciales*, destacando, por ejemplo, las de la médula ósea, que pueden diferenciarse a eritrocitos, leucocitos o plaquetas (Figura 4).

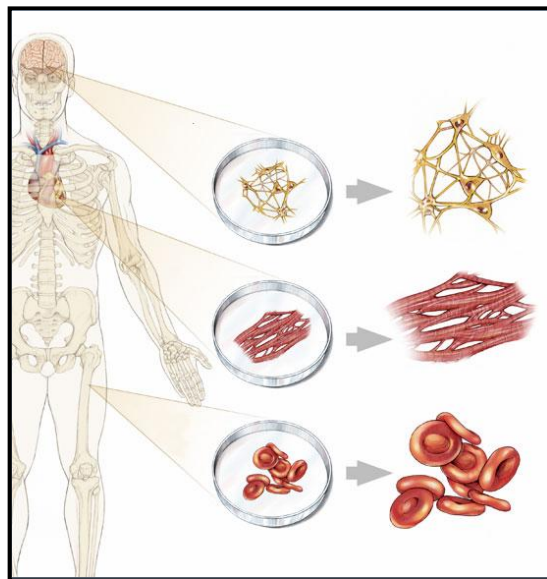


Figura 4. Representación esquemática de cómo las células troncales multipotentes originan células de su misma estirpe.

- **Unipotenciales:**

Son células que tienen capacidad para formar un único linaje celular. Por ejemplo: células troncales queratinocíticas de la capa basal del epitelio de la mucosa oral (Figura 5).

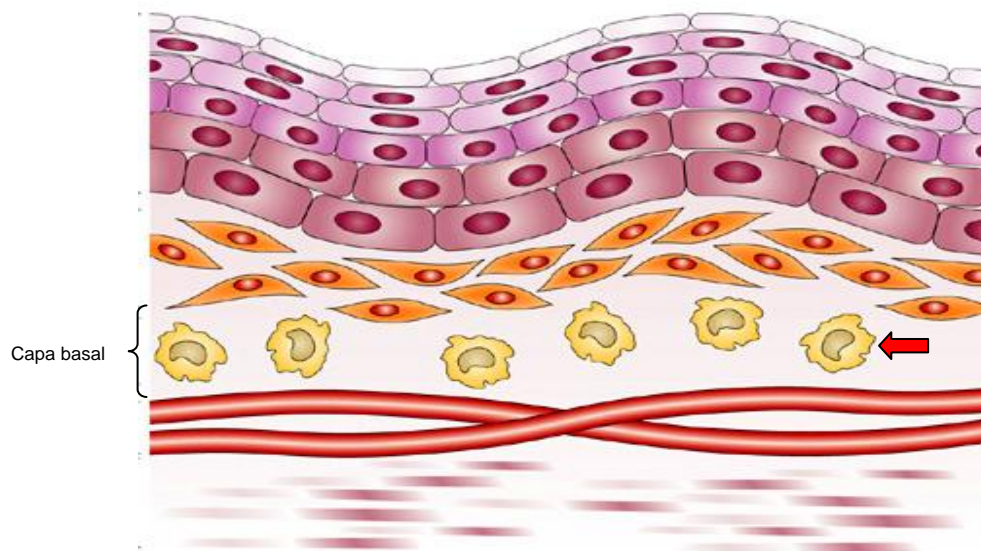


Figura 5. Las células troncales unipotentes en el caso de la mucosa oral se localizan en el estrato más profundo de la misma.

En relación con las células troncales, se ha demostrado recientemente que existen células adultas maduras que tienen capacidad de diferenciarse a una célula de otro linaje sin que éstas tengan que revertir a célula troncal o progenitora (Tsai *et al.*, 2002; Thowfeequ *et al.*, 2007). A esta capacidad de diferenciación se le ha llamado **transdiferenciación celular**. La *transdiferenciación* de una célula madura a otra célula diferenciada **puede deberse**: 1) a una *mutación* en la secuencia de nucleótidos del ADN, 2) a *alteraciones epigenéticas*, es decir, cambios que ocurren a nivel del genoma que no se deben a modificaciones de la secuencia de nucleótidos, sino a modificaciones en el patrón de expresión génica por procesos de metilación o acetilación del ADN entre otros, ó 3) a otros *factores ambientales* que intervienen en los cambios que se producen en la expresión génica (Thowfeequ *et al.*, 2007). Este fenómeno (la transdiferenciación celular) está en contraste con el proceso de *diferenciación*, el cual involucra una serie de etapas mediante las cuales una célula inmadura o indiferenciada modifica su fenotipo y su morfología para convertirse en una célula adulta madura (célula diferenciada). De esa manera, la célula podrá alcanzar una estructura y función especializada (Slack, 2002). En resumen, inducir la *transdiferenciación* de células diferenciadas con un fin terapéutico, puede ser importante en la **Medicina Regenerativa** ya que se evitarían, por un lado, los problemas éticos y oncológicos que presentan las células embrionarias, y por otro lado, la dificultad para obtener células troncales adultas. Algunos autores denominan también *transdiferenciación* al proceso que conduce de una célula madre determinada, esto es, orientada hacia una *diferenciación específica*, hacia una célula madura con una *orientación diferenciativa* diferente. Por ejemplo, la *transdiferenciación* de una célula madre *mesenquimal*, en una célula de naturaleza epitelial (Alaminos, *et al.* 2010). Este modelo de *transdiferenciación* será el que utilizaremos en la presente tesis doctoral.

1.1.2. Origen, es decir, en relación con el momento del desarrollo en el que surgen:

- **Embrionarias:**

Existen únicamente durante el periodo embrionario. Se pueden obtener a partir de la *masa celular interna del blastocisto* en el estadio de embrión preimplantatorio (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998), o bien, de la *cresta gonadal* (Matsui *et al.*, 1991; Resnick *et al.*, 1992; Shambloott *et al.*, 1998). Las células *troncales embrionarias* de la masa celular interna del blastocisto son *pluripotenciales*, es decir, son capaces de diferenciarse a cualquier tejido del organismo, incluyendo *tejidos somáticos* (corazón, hígado, etc.) y *germinales* (ovocitos y espermatozoides) (Geijsen *et al.*, 2004) (Figura 6).

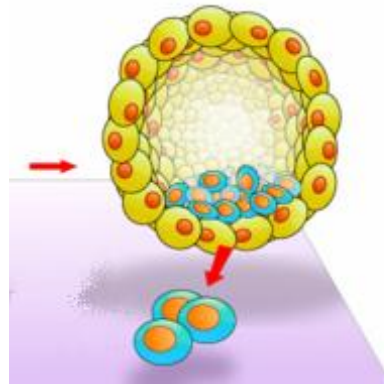


Figura 6. La célula madre embrionaria se obtiene de la masa celular interna del blastocisto y puede diferenciarse a cualquier tejido del organismo.

- **Adultas:**

Existen en el adulto, el feto y el cordón umbilical (Figura 7). Tienen una capacidad proliferativa y un potencial de *diferenciación* menores que las células troncales embrionarias. Son células *multipotenciales* o *unipotenciales*, y se han podido identificar en casi todos los tejidos del organismo (Raff, 2003).

Las *células troncales adultas* incluyen un tipo celular denominado células troncales mesenquimales, también llamadas células *progenitoras mesenquimales*. Estas células se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos, como por ejemplo en la médula ósea (Friedenstein *et al.*, 1974), la sangre periférica (Zvaifler *et al.*, 2000), el cordón umbilical (Troyer y Weiss, 2008), el hueso trabecular (Nöth *et al.*, 2002), el tejido adiposo (Pittenger *et al.*, 1999), el tejido sinovial (De Bari *et al.*, 2001), en los dientes deciduales (Miura *et al.*, 2003), en el músculo esquelético (Jankowski *et al.*, 2002) y en algunos tejidos del feto (Hu *et al.*, 2003; In't Anker *et al.*, 2003).



Figura 7. Las células troncales adultas se encuentran en los organismos humanos adultos y los que se encuentran en periodo gestacional.

1.2. BIOMATERIALES

Los *biomateriales* son compuestos de **origen natural** o *sintético*, sólidos o líquidos, que **se utilizan** en dispositivos médicos o en contacto con sistemas biológicos. En general, los *biomateriales* son sustancias farmacológicamente inertes utilizadas para ser incorporadas o implantadas dentro de un sistema vivo para *reemplazar* o *restaurar* alguna función, permaneciendo en contacto permanente o intermitente con fluidos corporales o tejidos humanos. Los *biomateriales*, como campo de estudio, han experimentado un crecimiento constante en aproximadamente medio siglo de existencia y se utilizan, entre otros, en medicina, biología, química e ingeniería. La generación de nuevos *biomateriales* para su aplicación en medicina es un proceso multidisciplinar en el que convergen los principios del diseño, de la física, la química, la ingeniería industrial, la ingeniería química y las ciencias de los materiales ([Grodzinski et al., 2006](#)).

En **ingeniería tisular** la generación de tejidos artificiales de naturaleza conectiva como hueso, cartílago, dermis, lámina propia de la mucosa oral, etc., utilizan algún tipo de material que actúe como sustituto de la matriz extracelular del tejido nativo ([Ma et al., 2005](#)). Para ello se utilizan varios tipos de *biomateriales*. La función de éstos en *ingeniería tisular* es la de funcionar de manera similar a la matriz extracelular natural. Esto es, promover la proliferación, la diferenciación y la biosíntesis de las células. Generalmente, las matrices extracelulares para la generación de tejidos por *ingeniería tisular* están compuestas por diferentes tipos de *biomateriales*. Estos compuestos deben cumplir ciertos **requisitos básicos**, entre ellos: ausencia de toxicidad, biocompatibilidad, ausencia de potencial carcinogénico y tolerancia a la esterilización previa a su uso.

Además, deben contar con **propiedades mecánicas** como la permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad; que permitan fabricar diferentes formas o estructuras tridimensionales sólidas (Yang *et al.*, 2001; Hutmacher *et al.*, 2001). Estos biomateriales, deben permitir la adhesión celular y la activación de los diferentes factores de crecimiento (Walgenbach *et al.*, 2001; Kwan *et al.*, 2007) y por último deberán de servir de vehículo para transportar las células utilizadas como fuente de obtención al sitio del tejido afectado (O'Driscoll, 1999).

Los biomateriales de uso en *ingeniería tisular* se dividen en tres grupos principalmente:

- **Biogénicos o biológicos**
- **Sintéticos**
- **Semisintéticos**

Los materiales **biogénicos** incluyen matrices acelulares como: *colágeno, alginato, la agarosa, glicosaminoglicanos y fibrina* (Bumgardner *et al.*, 2003; Saadeh *et al.*, 2001; Seol *et al.*, 2004; Solchaga *et al.*, 2002; Trubiani *et al.*, 2008). Los **polímeros sintéticos** incluyen *ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol, poli dimetil-siloxano*, los de tipo aromático con base de poli-éter como el *poliuretano termoplástico, poli etileno-tereftalato, poli etileno-tetrafluorado, poli vinilideno-fluorado* y *varios hidrogeles* (Behravesch *et al.*, 1999; Ishaug *et al.*, 1997; Neuss *et al.*, 2008). Finalmente, los materiales **semisintéticos** son una combinación de materiales biogénicos y de polímeros sintéticos (Munirah *et al.*, 2008) (Figura 8).

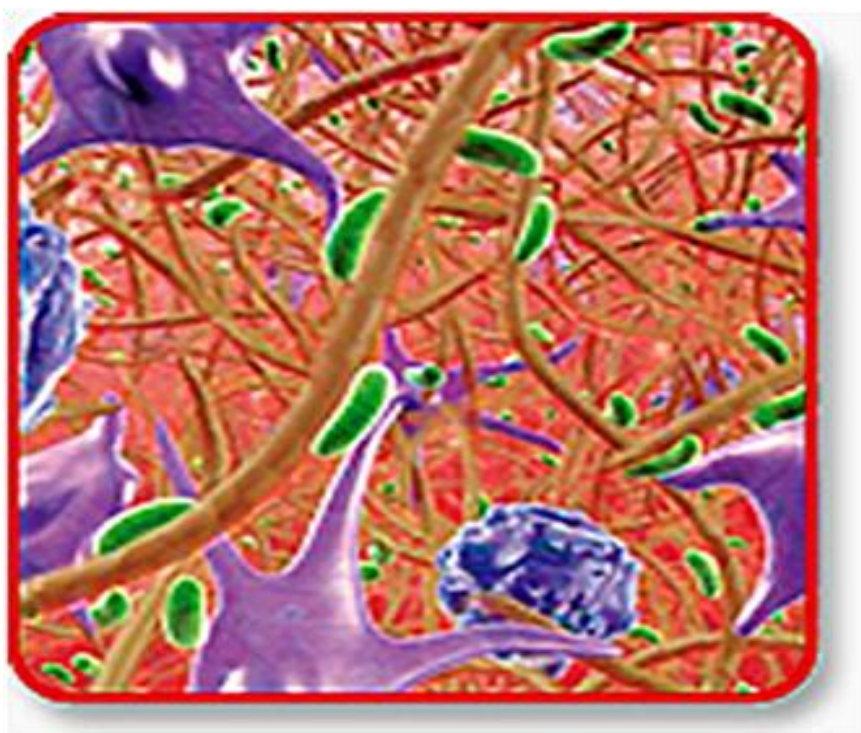


Figura 8. Las matrices extracelulares artificiales generadas a partir de biomateriales permiten la adhesión, adaptación y proliferación celulares.

1.3. FACTORES DE CRECIMIENTO

Una amplia variedad de proteínas y ácidos nucleicos juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células. Estos elementos son secretados de forma endógena por las células o bien, son el resultado de señales paracrinas con células vecinas. Estas proteínas y ácidos nucleicos son llamados *factores de crecimiento*.

Los factores de crecimiento que han sido frecuentemente usados en *ingeniería tisular* son, fundamentalmente, la proteína morfogenética osea (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF ó FGF-2), el factor de crecimiento vascular epitelial y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Lavik y Langer, 2004; Knight y Evans, 2004).

A este respecto, la adición adecuada de *factores de crecimiento* a células y matrices extracelulares artificiales, aumenta los niveles de regeneración de los tejidos generados mediante *ingeniería tisular*, en comparación con los que no reciben dicha adición (Lavik y Langer, 2004; Knight y Evans, 2004) (Figura 9).

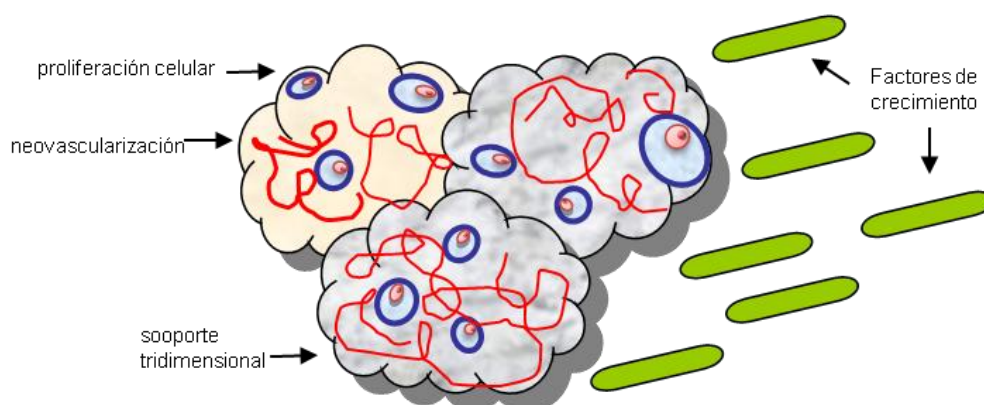


Figura 9. Las matrices extracelulares artificiales generadas a partir de biomateriales permiten la adhesión, adaptación y proliferación celulares.

2. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

La generación de *tejidos artificiales* requiere células con *potencialidad* alta y que sean *accesibles* como lo son las células troncales mesenquimales derivadas del *tejido adiposo* (**ASCs**) (De Ugarte *et al.*, 2003; McIntosh *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2006; Schaffler y Buchler, 2007), que son las células que utilizaremos como fuente de células troncales en la presente tesis doctoral. En este apartado describiremos sucesivamente el tejido adiposo y las características fundamentales de las ASCs existentes en su seno.

2.1. TEJIDO ADIPOSO

El **tejido adiposo** es una forma especializada de *tejido conectivo* que tiene una función importante en la homeostasis energética. En todo el tejido conjuntivo laxo aparecen células adiposas (adipocitos) individuales o reunidas en grupos. El tejido en el que los adipocitos constituyen el tipo *celular primario* recibe el nombre de *tejido adiposo*. Las células adiposas tienen como **función** principal almacenar sustancias *lipídicas* de reserva. Los **elementos celulares asociados** al tejido adiposo lo conforman preadipocitos, fibroblastos, células de tejido muscular liso, células endoteliales, monocitos, macrófagos y linfocitos (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Caspar-Bauguil *et al.*, 2005).

En el ser humano existen dos **clases** de tejido adiposo, la variedad más común es el *tejido adiposo unilocular* o “grasa amarilla”, cuyas células poseen una sola vacuola de lípido almacenado. La segunda variedad que es menos frecuente tanto en distribución como en cantidad, es el *tejido adiposo multilocular* o “grasa parda”, que se localiza de manera particular en el recién nacido.

Las *células adiposas* uniloculares del tejido adiposo amarillo son muy grandes, aproximadamente tienen una dimensión de más de 100 μm de diámetro a causa de la gran cantidad de lípidos que acumulan. A veces es posible encontrar pequeñas gotas de lípidos en la porción engrosada del citoplasma, susceptible también a poseer glucógeno. El lípido que se encuentra en la gran vacuola central se halla compuesto sobre todo por una mezcla de glicéridos de ácidos grasos.

El tejido adiposo unilocular se divide en lóbulos poco definidos por medio de tabiques de tejido conectivo. Con la excepción de estos tabiques interlobulares, el estroma está compuesto sobre todo por delicadas fibras de *reticulina* que también forman íntimas mallas que rodean a los capilares. La grasa blanca ha sido considerada en general como un tejido escasamente vascularizado. Sin embargo, cada célula adiposa, se halla en contacto por lo menos con un capilar.

Las células de grasa son células totalmente diferenciadas y no tienen división mitótica. Las nuevas células de grasa, en consecuencia, que se desarrollen en un momento dado en el interior del tejido conectivo, son resultado de la diferenciación de células más primitivas. Aunque las células de grasa, antes que acumulen lípido se asemejan a fibroblastos, es probable que provengan directamente de células mesenquimatosas indiferenciadas que se encuentran en su seno.

El *tejido adiposo* por tanto se renueva a partir de células *troncales mesenquimales* existentes en el mismo y según distintos autores se considera dicho tejido como posible fuente importante de células troncales para la *ingeniería tisular*.

Según Matsumoto, el *tejido adiposo* también contiene un grupo de células llamado **fracción vascular estromal (FVE)**, que puede aislarse por medio de centrifugación con previa digestión enzimática en colagenasa (Matsumoto *et al.*, 2008) (Figura 10).

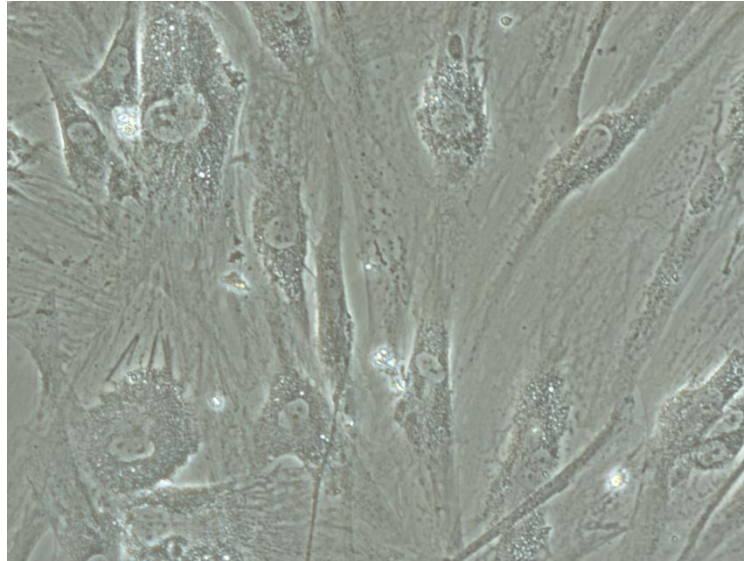


Figura 10. Cultivo celulares bidimensionales de ASCs, 20x.

Así mismo Schäffler y Büchler sugieren que la **FVE** contiene varias poblaciones celulares, entre las cuales figuran poblaciones de *células troncales mesenquimales multipotentes y pluripotentes (ASCs)*.

2.2. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ASCs)

La **obtención** de las ASCs es relativamente sencilla debido a que pueden utilizarse procedimientos quirúrgicos simples con anestesia local (Schäffler y Büchler, 2007). Mediante liposucción pueden llegar a obtenerse poblaciones celulares mayores de 100 millones en 250 a 500 mL por procedimiento (De Ugarte *et al.*, 2003). Por estas razones las ASCs son una de las fuentes celulares autólogas más prometedoras para su utilización en **medicina regenerativa** (Casteilla *et al.*, 2005; Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006).

Para diferenciar las ASCs de otros tipos celulares dentro del mismo tejido adiposo, existen estudios que muestran su expresión fenotípica propia de células troncales.

Las ASCs expresan entre otros, marcadores de superficie tales como: *CD9*, *CD10*, *CD13*, *CD29*, *CD44*, *CD49_d*, *CD49_e*, *CD54*, *CD55*, *CD59*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *CD106*, *CD146*, *CD166*, *TLRs-tool-like receptors TLR-1*, *TRL-2*, *TRL-3*, *TRL-4*, *TRL-5*, *TRL-6* y *TRL-9*, *STRO-1* (Cho *et al.*, 2005; Schäffler y Büchler, 2007; Simmons y Torok-Storb, 1991; De Ugarte *et al.*, 2003). El comité de tejidos de células troncales mesenquimales establece que los criterios que deben cumplir estas células son los siguientes: (Dominici *et al.*, 2006):

- Expresar: **CD73**, **CD90** y **CD105** (Figura 11).
- No expresar *kit-c*: **CD14**, **CD11b**, **CD34**, **CD45**, **CD19**, **CD79 α** .
- No expresar **(HLA)-DR**
- Tener potencialidad para diferenciarse a las estirpes **osteogénica**, **adipogénica** y **condrogénica**.
- Tener afinidad para adherirse a frascos de cultivo de material plástico *in vitro*.

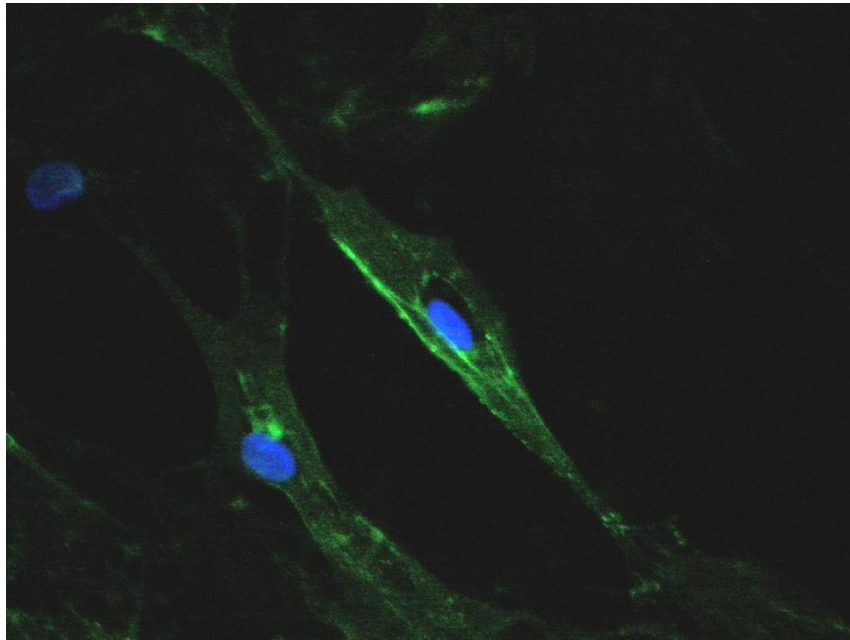


Figura 11. Expresión del marcador CD73, indicador de linaje de células troncales mesenquimales en cultivos celulares de ASCs en un modelo bidimensional. Este marcador se expresa en la membrana protoplasmática de estas células.

Hasta el momento, las ASCs han sido diferenciadas a varios tipos de tejidos en modelos bidimensionales que incluyen la diferenciación de ASCs a hueso (Weinzierl *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005), cartílago (Wei *et al.*, 2007), tejido adiposo (Yoshimura *et al.*, 2008) y neuronas (Lin *et al.*, 2008).

Al respecto, otros trabajos han evaluado dicha diferenciación utilizando soportes tridimensionales. Para generar hueso se han utilizado: quitosan (Im *et al.*, 2005), fibrina (B. Malafaya *et al.*, 2005) y fosfato tricálcico (Hattori *et al.*, 2006), para cartílago: agarosa y alginato o la gelatina (Lin *et al.*, 2005; Mehlhorn *et al.*, 2006; Awad *et al.*, 2004), para tejido adiposo: Alloderm (Yoo y Lim, 2009), sin que exista hasta el presente modelos para neuronas.

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha desarrollado recientemente un novedoso biomaterial compuesto por fibrina humana y agarosa (Alaminos *et al.*, 2006 y 2007; Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009), que ha sido utilizado con éxito para generar córneas y mucosa oral humanas, utilizando células epiteliales y del tejido conectivo. Dichas células han mostrado adecuados índices de adhesión y diferenciación en estos biomateriales. Sin embargo, la influencia de estas matrices artificiales compuestas por fibrina y agarosa no ha sido probada en los procesos de **transdiferenciación de las ASCs**. La utilización de este modelo generado mediante ingeniería tisular, podría tener importantes aplicaciones en el ámbito de la **odontoestomatología, traumatología y cirugía maxilofacial**.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Construir, mediante ingeniería tisular, sustitutos tridimensionales de tejido óseo, cartilaginoso, adiposo y nervioso para su uso experimental y terapéutico.

Objetivos específicos:

Para el logro de este objetivo general, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar y expandir células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (ASCs).
2. Transdiferenciar las ASCs bidimensionalmente hacia las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica mediante la utilización de medios inductores específicos.
3. Transdiferenciar las ASCs inmersas en un constructo tridimensional de fibrina-agarosa hacia las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica.
4. Caracterizar histológicamente e histoquímicamente las células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas y neurogénicas transdiferenciadas en cultivos bidimensionales.
5. Caracterizar histológicamente e histoquímicamente las células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas y neurogénicas transdiferenciadas en cultivos tridimensionales de fibrina-agarosa.
6. Identificar mediante un estudio comparado el modelo más adecuado para implementar la transdiferenciación osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica a partir de ASCs en relación con su posible utilización clínica.
7. Identificar y caracterizar genéticamente las ASCs y los tipos celulares osteogénico, condrogénico, adipogénico y neurogénico transdiferenciados.

MATERIALES
Y MÉTODOS

1. MUESTRAS DE TEJIDO HUMANO:

En este trabajo se utilizaron biopsias de tejido celular graso subcutáneo humano, las cuales se obtuvieron bajo anestesia local. El promedio del tamaño de las muestras fue de $3 \times 2.5 \times 2$ cm. Todos los tejidos utilizados correspondieron a donantes sanos sometidos a procedimientos quirúrgicos menores de tipo estético en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada en el servicio de cirugía plástica. Inmediatamente después de la escisión los tejidos se transportaron en medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich Inc. St. Luis, USA) suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B) (Sigma Inc., St. Luis, MO, USA) y se incubaron a 4^o C hasta el momento de su procesamiento.

Como controles se utilizaron muestras humanas nativas de hueso, cartílago, tejido adiposo y encéfalo.

Todos los donantes dieron su consentimiento para el uso de los tejidos en este trabajo, mientras que esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética e Investigación en la Universidad de Granada.

2. GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE ASCs:

A la llegada de las muestras al laboratorio, éstas se lavaron en solución fisiológica salina (*phosphated buffered saline PBS*) y el tejido adiposo se aisló mediante fragmentación mecánica. Después los explantes de tejido se sometieron a digestión enzimática en solución de colagenasa tipo I al 3% (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) durante ocho horas a 37° C. Finalmente, las células aisladas fueron obtenidas mediante centrifugación y cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich Co.) y antibióticos-antimicóticos (100 µg/mL de estreptomicina y 0,25 µg/mL de anfotericina B) en frascos de cultivo tipo *Falcon* para generar cultivos celulares bidimensionales (*CCA-Bdm*) (Figura 12).

El medio de cultivo se renovó cada tercer día. Una vez que las células alcanzaron un estado subconfluyente, los cultivos se tripsinizaron y subcultivaron en cámaras planas para cultivo (Nunc™, Roskilde, Dinamarca). Todas las células empleadas en este trabajo pertenecieron a los primeros cuatro subcultivos. Como muestras control, se cultivaron fibroblastos de mucosa oral humanos en las mismas cámaras planas de cultivo.

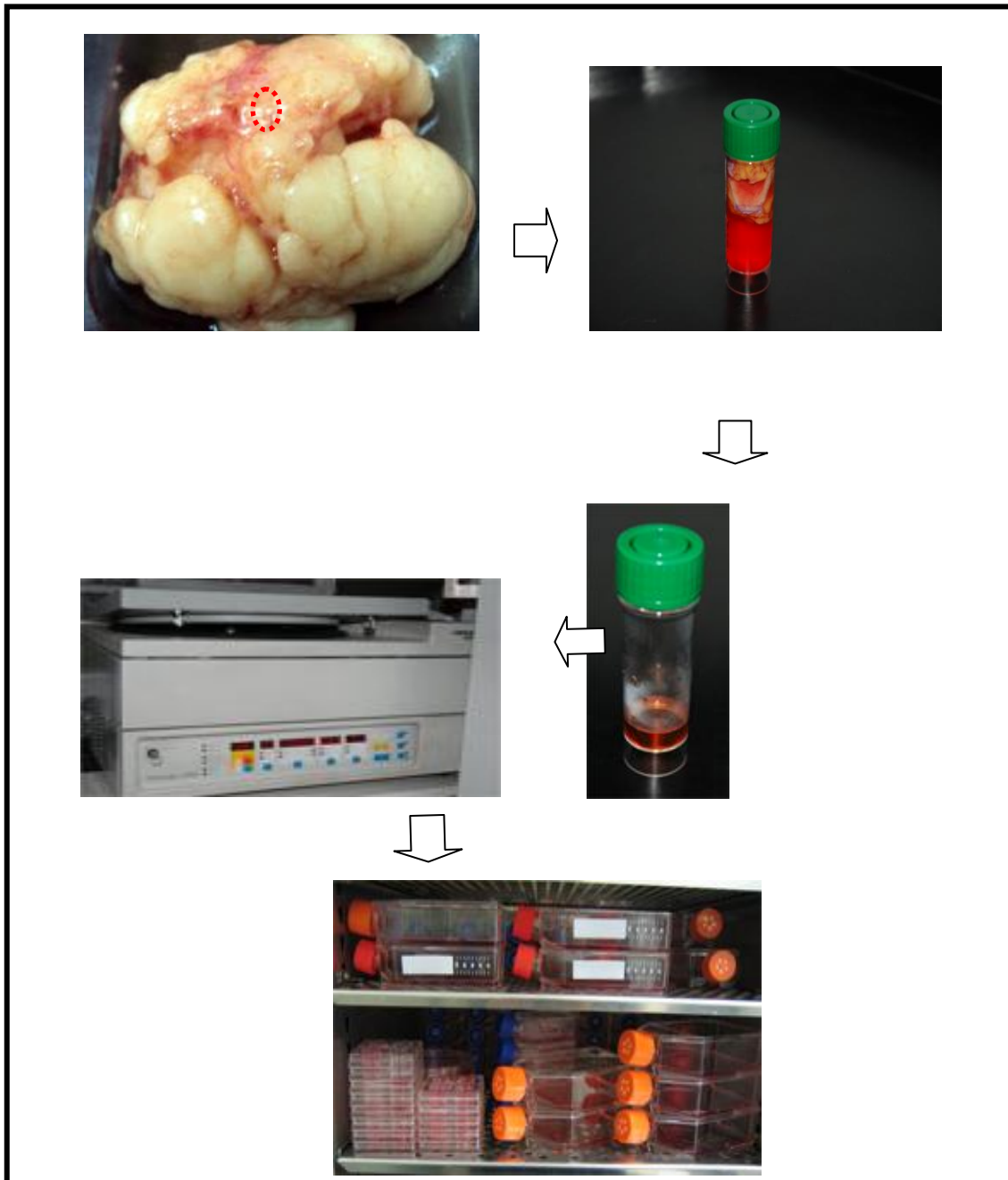


Figura 12. Procesamiento utilizado para la generación de cultivos primarios de ASCs a partir de muestras de tejido adiposo humano.

3. GENERACIÓN DE HIDROGELES DE FIBRINA-AGAROSA TRIDIMENSIONALES CON ASCs IMERSAS (HFA-Tdm):

Una vez que las ASCs alcanzaron un estado de subconfluencia, las células fueron tripsinizadas y aproximadamente 175,000 células por mL se sembraron en matrices extracelulares de fibrina-agarosa 0,1% utilizando soportes para cultivo con membrana permeable Transwell® (Corning incorporated, NY, USA) siguiendo protocolos previamente publicados. En todos los casos, los sustitutos estromales tridimensionales se generaron mediante la mezcla de plasma humano y agarosa tipo VII al 0,1% con ácido tranexámico como agente antifibrinolítico y cloruro de calcio como inductor de la reacción de polimerización de la fibrina, tal como se detalla a continuación. Para la generación de un hidrogel de 10 ml de volumen, se mezclaron los siguientes componentes en el orden que se indica:

- 7,6 ml de plasma sanguíneo humano.
- 750 µl de medio de cultivo DMEM en el que se resuspendieron las ASCs.
- 150 µl de ácido tranexámico (Amchafibrín®, Fides Ecofarma, Valencia, España).
- 1 ml de Cl₂Ca 1% (p/v).
- 0,5 ml de agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045) disuelta al 2% (p/v) en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión.

Una vez que el hidrogel polimerizó, los constructos artificiales se cubrieron con el medio de cultivo basal.

Como grupo control, se generaron hidrogeles de fibrina-agarosa con fibroblastos orales humanos sembrados con aproximadamente 175,000 células por mL (Figura 13).

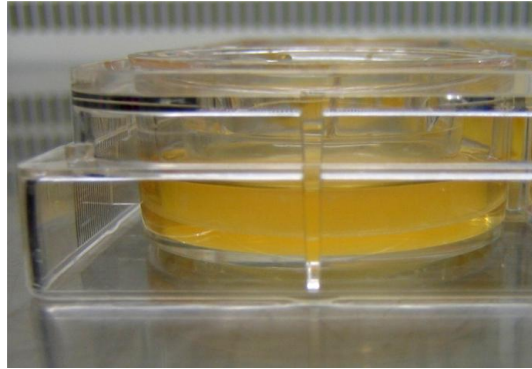


Figura 13. Constructos tridimensionales generados mediante ingeniería tisular.

4. INDUCCIÓN DE LA TRANSDIFERENCIACIÓN DE LOS CULTIVOS *CCA-Bdm* y *HFA-Tdm* A LOS LINAJES OSTEOGÉNICO, CONDRÓGENICO, ADIPOGÉNICO Y NEUROGÉNICO:

Para llevar a cabo la inducción de los cultivos *CCA-Bdm* y *HFA-Tdm* a las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica, las muestras fueron cultivadas en diferentes medios de inducción. Estos medios de cultivo inductores consistieron en DMEM como medio basal, suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos-antimicóticos que fueron a su vez suplementados con diferentes factores de crecimiento y reactivos inductores (Figura 14), tal como se muestra a continuación:

- Para la inducción hacia el linaje osteogénico, el medio basal fue suplementado con 100 nM de dexametasona, 10 mM de β -glicerol fosfato y 50 μ M de L-ácido ascórbico.
- Para la inducción condrogénica, se añadieron 40 μ g/mL de L-prolina, 100 μ g/mL de piruvato, 10 ng/mL de TGF- β , 50 μ M de ácido ascórbico e insulina-transferrina-selenio (*ITS*) 5 mg/mL.

- Para la diferenciación adipogénica, el medio basal fue suplementado con 1 μM de dexametasona, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina e ITS 5mg/mL.
- Para la inducción neurogénica, el medio basal fue suplementado con 20 nM de ácido valpróico, 1 μM de hidroxianisol butilado (*BHA*), 50 Mm de cloruro de potasio, 10 nM de forskolin, 1nM de hidrocortisona y 5mg/mL de ITS.

Todas las células y los tejidos *bio-generados* por ingeniería tisular se cultivaron en los diferentes medios de inducción durante veinte días y el proceso de transdiferenciación se analizó a su vez después de veinticuatro horas, diez días y veinte días, una vez suplementados los cultivos con el medio inductor correspondiente.

Como controles negativos, cultivos de *CCA-Bdm* y *HFA-Tdm* se suplementaron con medio de cultivo basal sin reactivos inductores y con factores de crecimiento inductores.

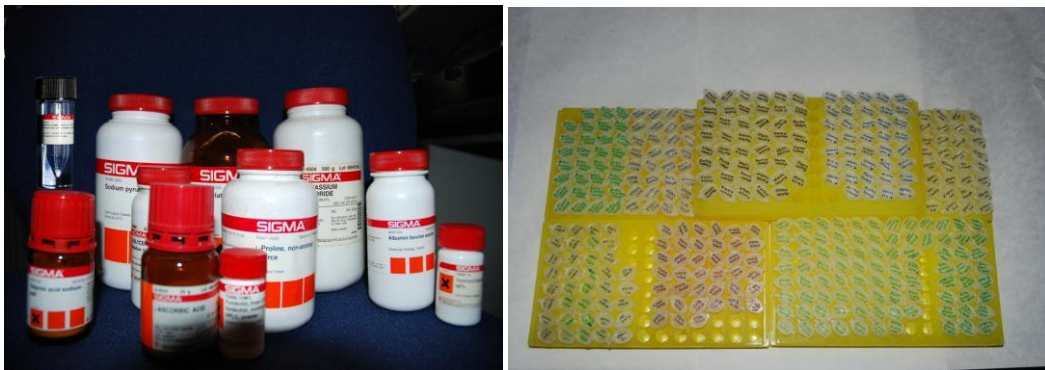


Figura 14. Diferentes factores de crecimiento utilizados para inducir los constructos tridimensionales y los modelos bidimensionales a hueso, cartílago, grasa y tejido nervioso artificiales. Estos compuestos se alicuotaron y conservaron a 4°C hasta el momento de su incorporación al medio de cultivo basal.

5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO:

Después de completarse los diferentes periodos de inducción, todas las muestras se lavaron en solución salina fisiológica (*PBS*) y se fijaron en formaldehído al 4% (Sigma-Aldrich). El análisis mediante tinción para las muestras de *CCA-Bdm* se llevó a cabo directamente en portaobjetos dotados de cámaras de cultivo (*chamber slide system*, Nunc[®], Roskilde, Dinamarca), mientras que se utilizó el método de inclusión en parafina en las muestras de tejido artificial *HFA-Tdm*.

Para determinar el fenotipo osteogénico e identificar señales de mineralización, las muestras se tiñeron con rojo alizarín S al 2% por cinco minutos a temperatura ambiente. La diferenciación condrogénica se confirmó mediante tinción para mucopolisacáridos usando una solución de azul alcian (1% de Azul Alcian 8GX y 3% de ácido acético glacial, ajuste de pH al 2,5). La diferenciación adipogénica fue identificada mediante la tinción de *oil red O* (0,7 mg en 100 mL de propileno-glicol) por cinco minutos a 60° C. El análisis morfológico de todas las muestras se llevó a cabo con tinción convencional de hematoxilina-eosina (*HyE*). Finalmente, todas las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio óptico y el porcentaje de células teñidas por campo fue determinado con ayuda del software de NIS-Elements (Nikon, Tokio, Japón).

Como controles, muestras de tejido humano nativo de hueso, cartílago, grasa y encéfalo fijadas en formaldehído e incluidas en parafina fueron procesadas y teñidas siguiendo los mismos protocolos usados en las muestras experimentales.

Para el análisis estadístico, se utilizó el test exacto de Fisher para la comparación del porcentaje de células positivas entre *CCA-Bdm* y *HFA-Tdm*, considerando todos los valores p menores que 5% como significativos en los tests de doble cola.

6. INMUNOFLUORESCENCIA:

Después del proceso de inducción de los cultivos *CCA-Bdm* en los portaobjetos con cámaras de cultivo, las células se lavaron por diez minutos en PBS y se fijaron en etanol al 70% por treinta minutos. Para el ensayo de inmunofluorescencia las células se lavaron en agua destilada, se preincubaron en suero de caballo al 2,5% y se incubaron durante dos horas con uno de los siguientes anticuerpos según el linaje a estudiar: anti-fosfatasa alcalina (hecho en cabra, 1:200, Sigma-Aldrich), anti-colágeno tipo II (hecho en ratón, 1:200 Santa Cruz Antibodies, USA), anti-leptina-OB (hecho en ratón, 1:200, sigma-Aldrich) y anti-nestina (hecho en conejo, 1:250, abcam, RU). Después, las muestras se lavaron en PBS y se incubaron por treinta minutos en los anticuerpos secundarios conjugados específicos para cada caso: anticuerpo secundario específico para reconocer anticuerpos hechos en el ratón y marcados con el pigmento fluorescente FITC, anticuerpo anti-anticuerpos de cabra marcado con Cy3 y anticuerpo anti-anticuerpos de conejo marcado con Cy3 (Sigma-Aldrich) (Figura 15). Finalmente, las muestras se lavaron en PBS, se cubrieron con cubreobjetos con medio de montaje con DAPI y se analizaron usando un microscopio óptico de fluorescencia (Eclipse i90, Nikon Co., Japón).

Por otro lado, las muestras de tejido humano nativo usadas como control y los cultivos *HFA-Tdm* transdiferenciados, se lavaron en PBS y se fijaron en metacarn (metanol: cloroformo:ácido acético glacial, 60:30:10) por seis horas a 4°C (Figura 16).



Figura 15. Incubación de los anticuerpos para fosfatasa alcalina, colágeno tipo II, leptina y nestina en las cámaras de cultivo planas en el modelo de cultivo bidimensional.

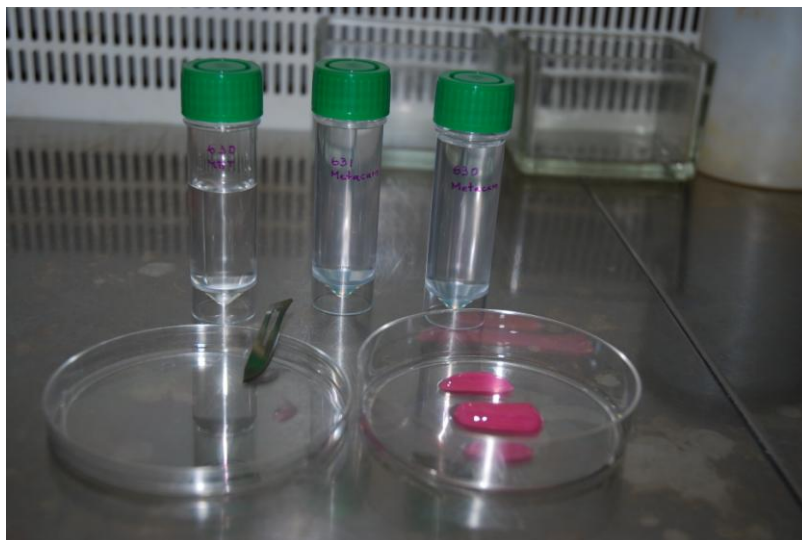


Figura 16. Obtención de muestras de constructos para su procesamiento histológico.

Después, las muestras se lavaron dos veces y se deshidrataron en etanol 100%, se incluyeron en parafina, se cortaron a 5 μm y se montaron en portaobjetos para su observación en microscopio óptico.

Después de esto, todas las muestras fueron desparafinizadas en xilol, se rehidrataron en alcoholes descendientes (100, 95, 70, 50%) y por último en agua destilada, se preincubaron en suero de caballo al 2,5% y se incubaron por dos horas en uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-fosfatasa alcalina (1:200), anti-colágeno tipo II (1:200), anti-leptina-OB (1:200) y anti-nestina (1:250). Luego, las muestras se lavaron en PBS y se incubaron por treinta minutos en los anticuerpos secundarios conjugados específicos para cada caso: anticuerpo secundario específico para reconocer anticuerpos hechos en el ratón y marcados con el pigmento fluorescente FITC, anticuerpo anti-anticuerpos de cabra marcado con Cy3 y anticuerpo anti-anticuerpos de conejo marcado con Cy3 (1:500, Sigma-Aldrich). Finalmente las muestras se lavaron en PBS, se cubrieron con medio de montaje que contenía DAPI (Vector Laboratories, Peterborough, R.U.) y se analizaron usando un microscopio de fluorescencia.

Como controles positivos, se utilizaron muestras nativas de tejido humano de hueso, cartílago, grasa y encéfalo, las cuales fueron procesadas siguiendo los mismos protocolos del ensayo de inmunofluorescencia (Figura 14). El análisis estadístico se realizó comparando el porcentaje de células positivas a la transdiferenciación de ambos grupos, los cultivos de *CCA-Bdm* y *HFA-Tdm* utilizando el test exacto de Fisher, considerando a todos los valores p menores de 5% como estadísticamente significativos para los tests de doble cola.

**7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS CULTIVOS CCA-Bdm Y HFA-Tdm
USANDO OLIGONUCLEÓTIDOS DE ALTA DENSIDAD MEDIANTE
MICROARRAYS:**

Para el análisis mediante *microarrays* de oligonucleótidos, se extrajo el ARN total correspondiente a los cultivos CCA-Bdm no inducidos e inducidos. El ARN fue extraído utilizando el sistema de Qiagen Rneasy System (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez extraído, la concentración del ARN se cuantificó mediante espectrofotometría con una absorbancia a 260 nm y la calidad se verificó utilizando un bioanalizador (Agilent) (Figura 17).



Figura 17. El bioanalizador Agilent tiene capacidad para evaluar la calidad del ARN desde 250 pg del ARN total.

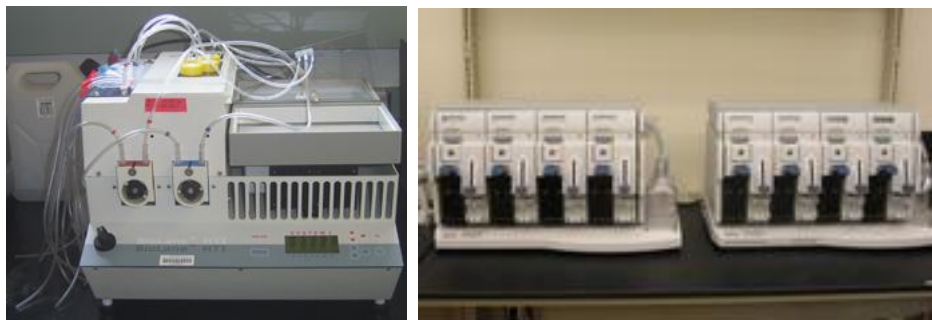


Figura 18. a.) Hibridación frente al sistema de Affimetrix genechip del genoma humano versión U133.

Para el análisis mediante microarray, se utilizó el sistema de *microarray* humano Affymetrix Genechip Human Genome U133 plus[®] (Figura 18). Este sistema contiene 54.675 genes y secuencias génicas expresadas (EST), incluyendo 62 genes control, siendo el más completo del mercado. De este modo, se pudo cuantificar la expresión relativa de un gran número de genes o secuencias expresadas contenidas en este sistema de Affymetrix. Para este análisis, en primer lugar se sintetizó el cDNA total correspondiente a 5-10 µg de ARN de la muestra utilizando un primer T7-polyT y una transcriptasa reversa (Superscript II, Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Posteriormente, el cDNA se transcribe *in vitro* con UTP y CTP biotiniladas (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). Finalmente, los cRNA marcados con biotina se hibridaron a 45°C durante diez y seis horas frente al sistema Affimetrix Human Genome U133 plus 2.0. Después de un lavado y marcado automático, los valores absolutos de expresión fueron calculados y normalizados desde el array escaneado usando el sistema Affimetrix Microarray Suite.

En este trabajo, seleccionamos noventa y cinco genes con funciones relevantes relacionadas directamente con cada tipo de transdiferenciación celular (para células precursoras de osteoblastos, de condrocitos, de adipocitos y de neuronas). Para identificar los genes sobreexpresados tras el proceso de inducción, primero se calcularon las medias de expresión del grupo control (cultivos no inducidos de ASCs) y luego los diferentes cultivos *CCA-Bdm* sometidos al proceso de transdiferenciación. Posteriormente, se calcularon los valores de expresión diferencial entre los 2 grupos (*Fold-Changes* o *FC*). En este paso, todos los genes con un *fold change* relativo de al menos 1,2 (p.ej. los genes en los que el promedio de expresión génica estaba sobreexpresada por lo menos en un 20% en comparación con el control de ASCs) fueron seleccionados.

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE ASCs:

Las ASCs obtenidas a partir del tejido celular adiposo subcutáneo utilizando los métodos descritos en el apartado de “*Materiales y Métodos*” correspondiente, mostraron un adecuado crecimiento celular en los primeros subcultivos, viéndose disminuido el ritmo de crecimiento a partir del VII subcultivo. El nivel de confluencia celular en las cajas de cultivo tipo *Falcon* se consiguió aproximadamente después de doce días de cultivo. La morfología propia de las ASCs mostró en subconfluencia un aspecto celular estrellado, que al ir confluyendo cambió a alargado hasta terminar en confluencia extrema con una morfología recordando a la formas celulares fibroblásticas (Figura 19).

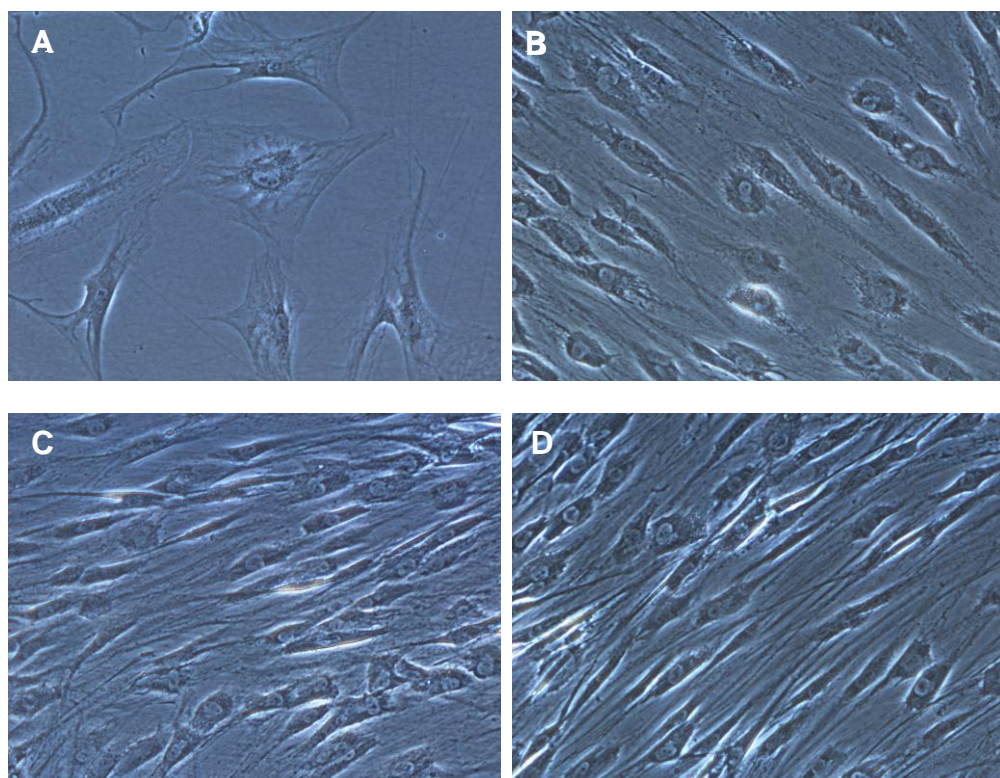


Figura 19. Subcultivos celulares de ASCs mostradas durante diferentes periodos de tiempo. 20x.
A: 24 horas. B: 7 días. C: 14 días. D: 21 días. La morfología celular fibroblástica surge en estados de confluencia.

2. INDUCCIÓN A LA ESTIRPE OSTEOGÉNICA:

Como se muestra en la Figura 20 y el cuadro 1, el análisis histológico de los cultivos *bidimensionales* inducidos a células precursoras de osteoblastos respecto a los grupos control, reveló que la producción de una matriz extracelular calcificada no se inició en las veinticuatro primeras horas de inducción (0% de área teñida por campo visual) para ambos métodos histológicos: el correspondiente a la tinción con rojo alizarín S y la ausencia de fosfatasa alcalina en la inmunofluorescencia. Posteriormente, cuando las células fueron cultivadas en el medio osteoinductivo por diez días, se generó una matriz extracelular calcificada en algunas áreas del cultivo (5,24% de las células teñidas por campo visual), con la expresión de fosfatasa alcalina en 6,26% de las células. Finalmente, las células incubadas en el medio osteoinductor durante veinte días mostraron amplias áreas de matriz celular calcificada a lo largo del cultivo que correspondieron al 47,29% de células que se tiñeron por campo visual y con un 40,6% de células expresando fosfatasa alcalina en inmunofluorescencia.

Por otra parte, el análisis histológico de los constructos *tridimensionales* de este estudio, revelaron que algunas células en dichos cultivos se transdiferenciaron en células precursoras de osteoblastos después de diez y veinte días de inducción (7,60% de células positivas para la tinción de rojo alizarín S y un 93,8% de fosfatasa alcalina después de diez días de inducción y 74,56% y 100%, respectivamente después de veinte días de inducción) (Figuras 21 y 22, Cuadro 2). Como se muestra en el cuadro 3, el porcentaje de células positivas fue significativamente mayor en el modelo de cultivo *tridimensional* que en el modelo de cultivo *bidimensional* para fosfatasa alcalina después de diez días y para fosfatasa alcalina y para rojo alizarín S después de veinte días ($p=0,000$).

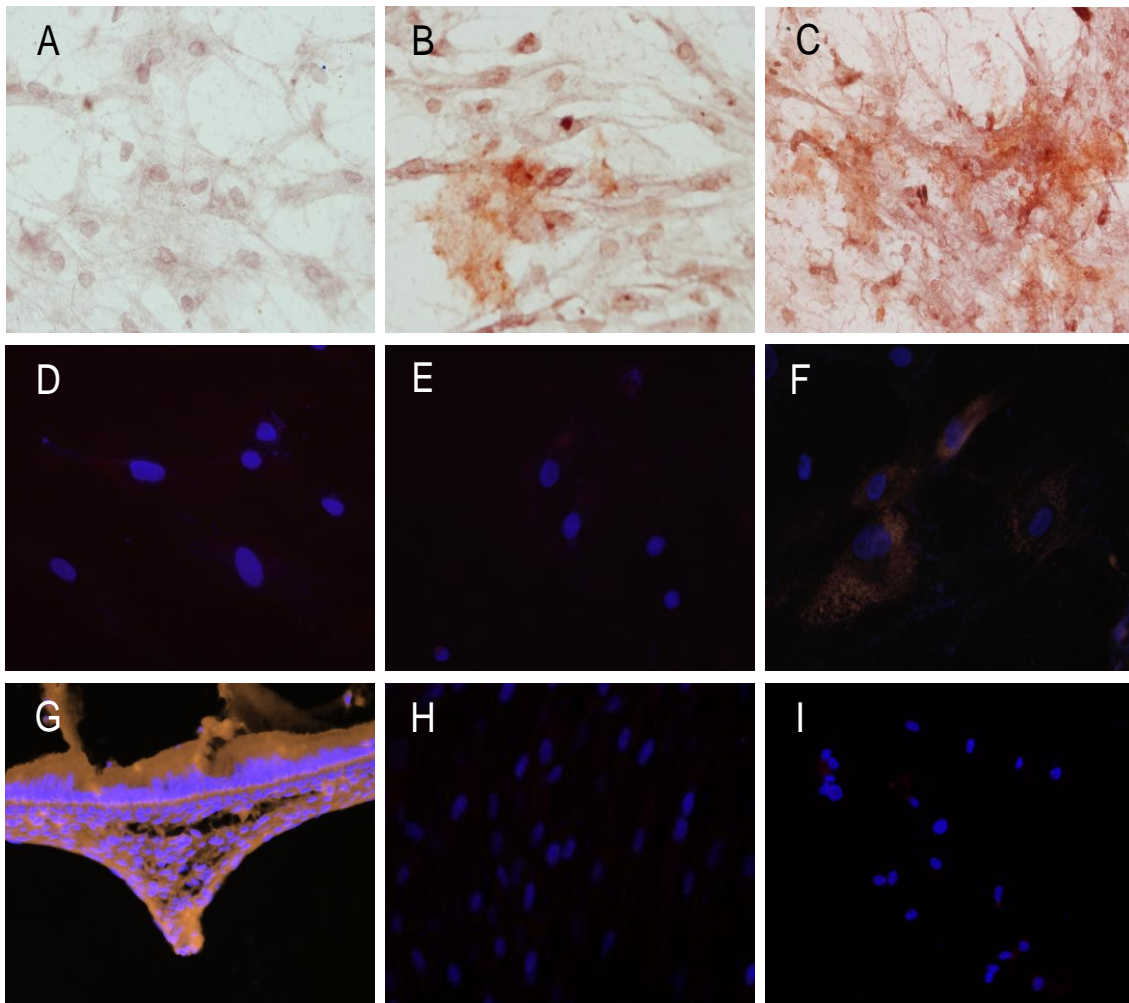


Figura 20. Diferenciación de las ASCs en el modelo bidimensional hacia el linaje osteogénico. 20x. **A, B y C:** Tinción rojo alizarin S en ASCs cultivadas por 24 horas, 10 días y 20 días, respectivamente. **D, E y F:** Inmunofluorescencia para fosfatasa alcalina en ASCs inducidas por 24 horas, 10 días y 20 días, respectivamente. La coloración anaranjada corresponde a la expresión positiva de fosfatasa alcalina. **G:** Inmunofluorescencia para fosfatasa alcalina en hueso control. **H:** Inmunofluorescencia para fosfatasa alcalina en fibroblastos humanos de mucosa oral control incubados en medio osteogénico. **I:** Inmunofluorescencia para fosfatasa alcalina de ASCs no inducidas.

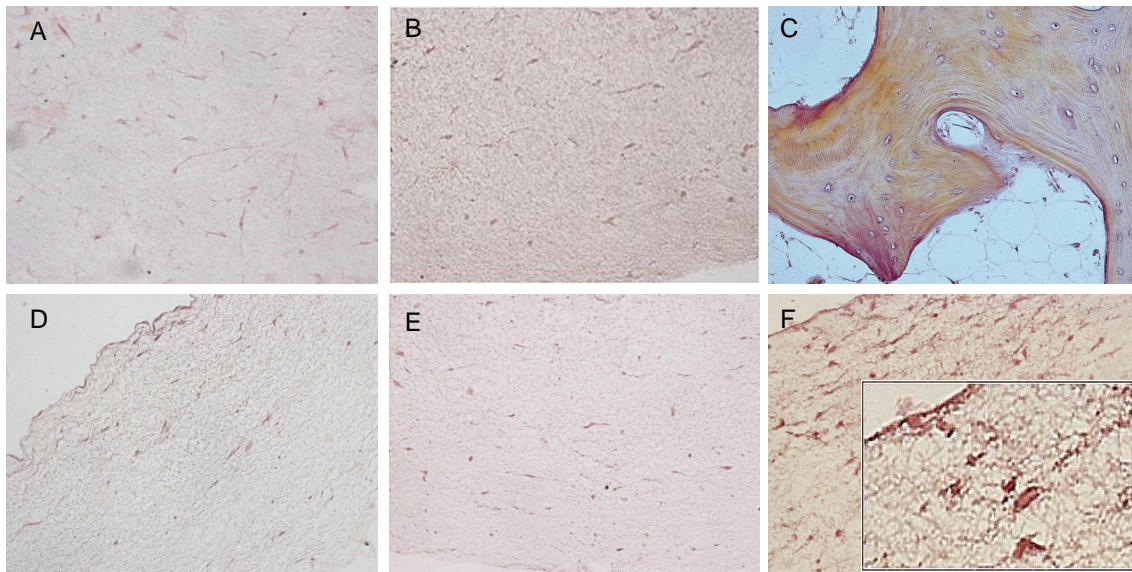


Figura 21. Tinción rojo alizarin S. 20x. Diferenciación osteogénica del modelo HFA-Tdm. **A, B y C:** Grupos control. **A:** Fibroblastos orales humanos inducidos por 20 días a tejido óseo. **B:** ASCs cultivadas en medio basal sin factores de inducción. **C:** Hueso humano. **D, E y F:** HFA-Tdm inducidos al linaje osteogénico por 24 horas, 10 y 20 días respectivamente.

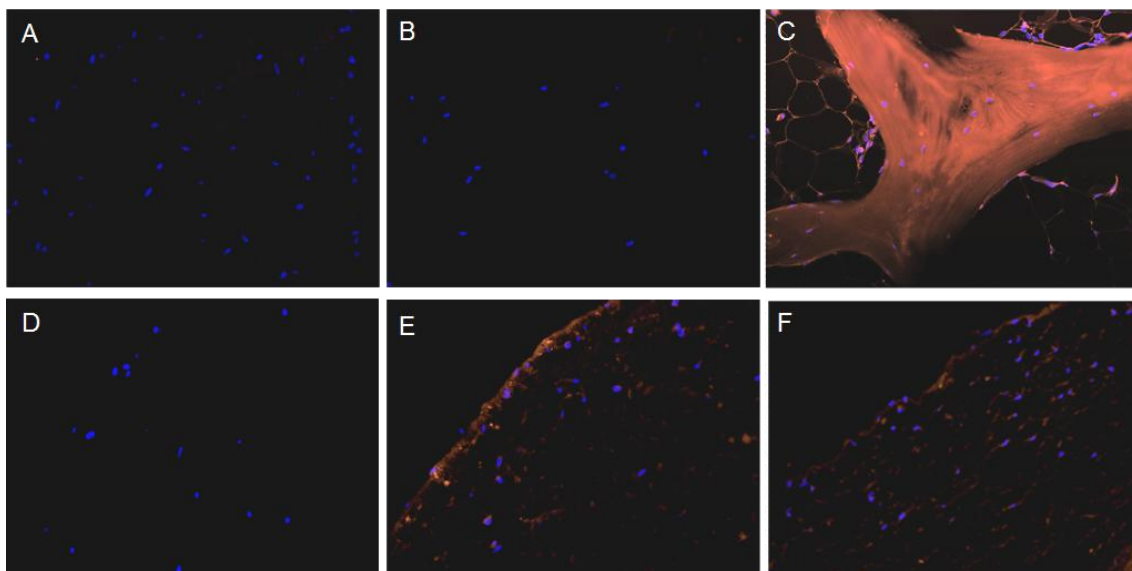


Figura 22. Inmunofluorescencia para fosfatasa alcalina con DAPI. Diferenciación de HFA-Tdm hacia el linaje osteogénico. 20x. **A, B y C:** Grupos control. **A:** Fibroblastos orales humanos inducidos por 20 días a tejido óseo. **B:** ASCs cultivadas en medio basal sin factores de inducción. **C:** Hueso humano. **D, E y F:** HFA-Tdm inducidos al linaje osteogénico por 24 horas, 10 y 20 días respectivamente.

3. INDUCCIÓN A LA ESTIRPE CONDRÓGENICA:

En primer lugar, nuestros resultados revelaron que la inducción de CCA-Bdm hacia el linaje condrogénico después de veinticuatro horas no fue positivo para generar niveles detectables de transdiferenciación celular, hecho que demostró el azul alcian y la expresión de colágeno tipo II (0% de células teñidas por campo visual) (Figura 23 y Cuadro 1). Sin embargo, los cultivos a CCA-Bdm inducidos por diez días en el medio condrogénico mostraron un alto porcentaje de células transdiferenciadas a células precursoras de condrocitos (84,08% de positividad al azul alcian y un 92,34% de células positivas a colágeno tipo II). Este porcentaje sin embargo, fue mayor en los cultivos que fueron inducidos durante veinte días (94,94% para azul alcian y 93,00% por inmunofluorescencia).

De manera similar, el análisis de los cultivos HFA-Tdm inducidos al linaje cartilaginoso mostraron que el proceso de transdiferenciación no fue efectivo después de veinticuatro horas de inducción, con 0% de células transdiferenciadas (Figuras 24, 25 y Cuadro 2). Sin embargo, cuando estos tejidos bio-generados por ingeniería tisular se indujeron durante diez días, el 14,8% de las células eran positivas a la tinción de azul alcian, con 80% de las células positivas a la expresión de colágeno tipo II por inmunofluorescencia.

El análisis estadístico demostró que estos porcentajes fueron significativamente menores que aquellos mostrados por el modelo de cultivo CCA-Bdm ($p=0.0000$ para azul alcian y $p=0,0236$ para inmunofluorescencia) (Cuadro 3). Finalmente, los tejidos inducidos al linaje condrogénico durante veinte días mostraron que un 98,7% del tejido se tiñó fuertemente con azul alcian y que un 86,7% de las células expresaron colágeno tipo II.

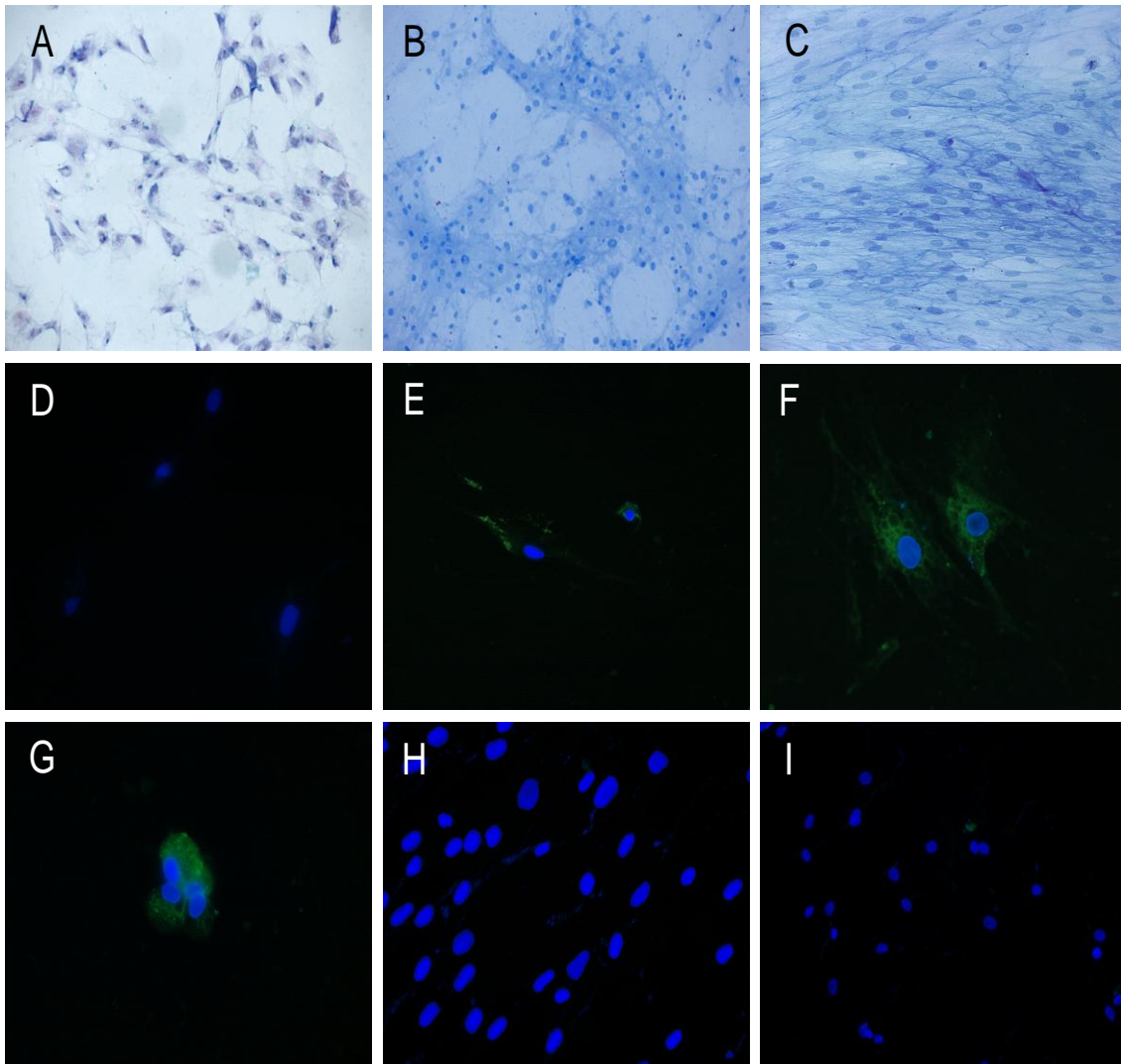


Figura 23. Diferenciación de las ASCs en el modelo bidimensional hacia el linaje condrogénico. 20x. **A, B y C:** Tinción azul alcian en ASCs cultivadas por 24 horas, 10 días y 20 días, respectivamente. **D, E y F:** Inmunofluorescencia para colágeno tipo II en ASCs inducidas por 24 horas, 10 días y 20 días, respectivamente. **G, H e I:** Inmunofluorescencia para colágeno tipo II con DAPI. **G:** Inmunoreactividad en cultivo primario de condrocitos control. **H:** Fibroblastos de mucosa oral control incubados en medio condrogénico. **I:** Inmunofluorescencia de ASCs no inducidas.

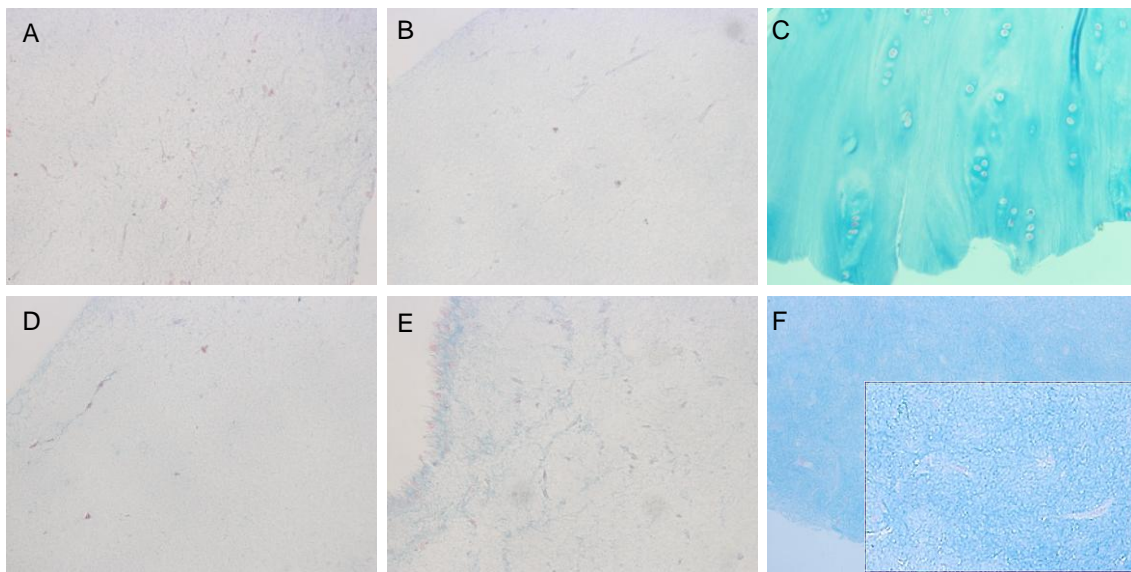


Figura 24. Tinción con azul alcian. 20x. Diferenciación condrogénica del modelo HFA-Tdm. **A, B y C:** Grupos control. **A:** Fibroblastos orales humanos inducidos por 20 días a cartílago. **B:** ASCs cultivadas en medio basal sin factores de crecimiento. **C:** Cartílago humano. **D, E, y F:** HFA-Tdm inducidos al linaje condrogénico por 24 horas, 10 y 20 días respectivamente.

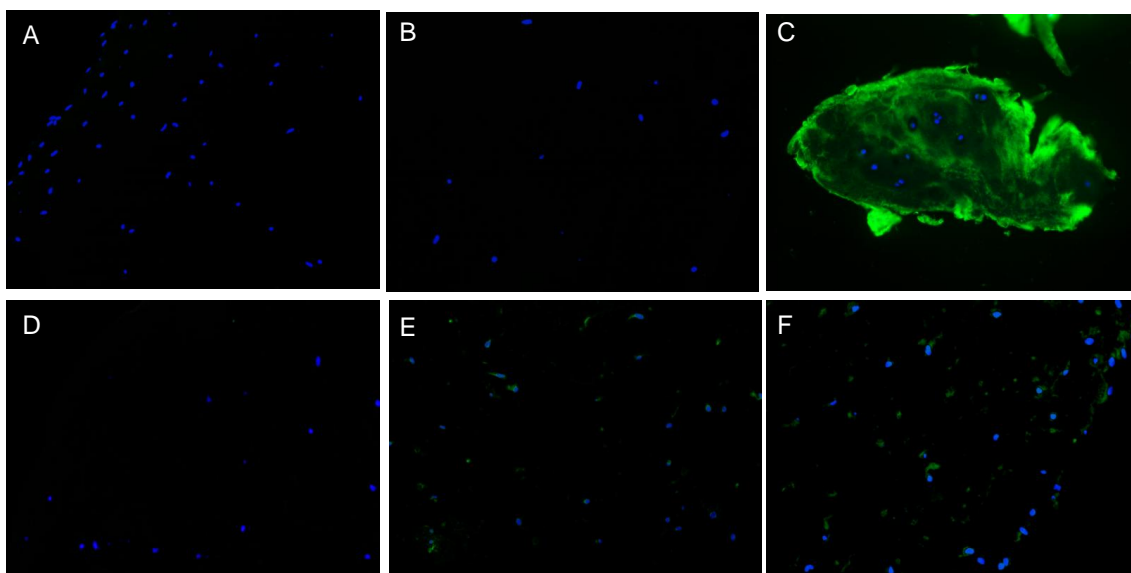


Figura 25. Inmunofluorescencia para colágeno tipo II con DAPI. Diferenciación de HFA-Tdm hacia el linaje condrogénico. 20x. **A, B y C:** Grupos control. **A:** Fibroblastos orales humanos inducidos por 20 días a cartílago. **B:** ASCs cultivadas en medio basal sin factores de crecimiento. **C:** Cartílago humano. **D, E y F:** HFA-Tdm inducidos al linaje condrogénico por 24 horas, 10 y 20 días respectivamente.

4. INDUCCIÓN A LA ESTIRPE ADIPOGÉNICA:

El análisis histológico de los cultivos CCA-Bdm inducidos por veinticuatro horas y diez días hacia el linaje adipogénico no mostraron la presencia de ninguna vacuola con contenido lipídico con la tinción de oil red O, con 0% de las células expresando leptina por inmunofluorescencia después de veinticuatro horas de inducción. Sin embargo, el 90,5% de las células incubadas por diez días en el medio adipogénico mostraron inmunoreactividad a leptina (Figura 26 y Cuadro 1). Finalmente, un tercio de las células inducidas durante veinte días mostraron positividad a la tinción histoquímica con oil red O, mientras que el 98,1% de las células expresaron leptina.

De manera similar, nuestro análisis del sistema HFA-Tdm mostró que el proceso de transdiferenciación adipogénico no fue eficiente a las veinticuatro horas y que el 0% de las células se tiñó con oil red O después de diez días de inducción. Sin embargo, el 87% de las células inducidas por diez días expresaron intensamente leptina. Luego, cuando los constructos HFA-Tdm *bio-generados* con ingeniería tisular fueron inducidos durante veinte días, el porcentaje de las células positivas a la tinción de oil red O fue significativamente mayor que el de los cultivos CCA-Bdm (92,3% en los cultivos y 33,33% en los $p=0,0000$), aunque la proporción de las células que expresaron leptina fue significativamente menor en comparación con los cultivos de (87,9% en los HFA-Tdm y 98,1% en CCA-Bdm; $p=0,0101$) (Figura 27, 28 y Cuadro 3).

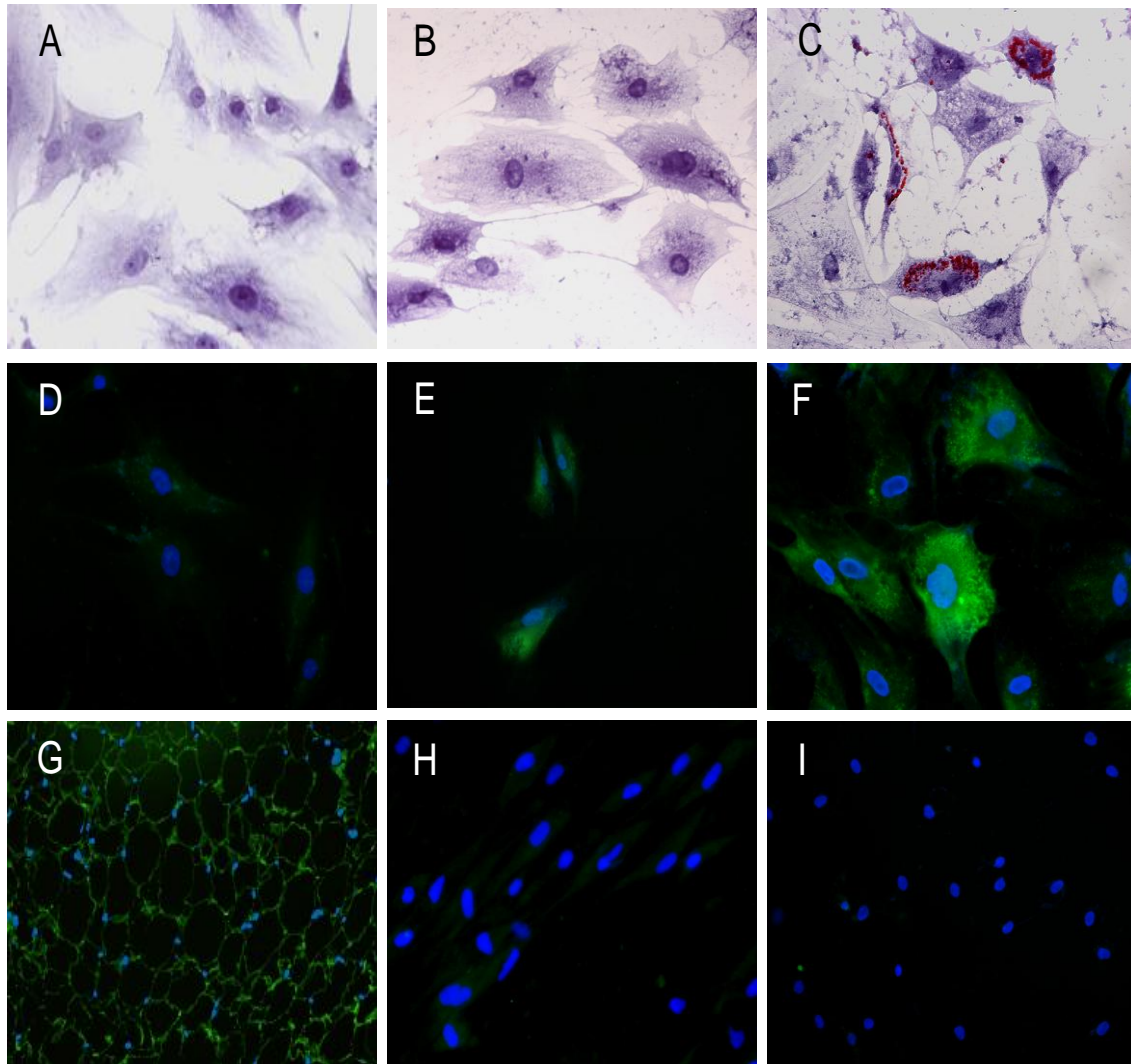


Figura 26. Diferenciación de las ASCs en el modelo bidimensional hacia el linaje adipogénico. 20x. **A, B y C:** Tinción oil red o en ASCs cultivadas por 24 horas, 10 días y 20 días, respectivamente. **D, E y F:** Inmunofluorescencia para leptina en ASCs inducidas por 24 horas, 10 días y 20 días, respectivamente. **G,** **H e I:** Inmunofluorescencia para leptina con DAPI. **G:** Inmunoreactividad en tejido adiposo control. **H:** Fibroblastos de mucosa oral control incubados en medio adipogénico. **I:** Inmunofluorescencia de ASCs no inducidas.

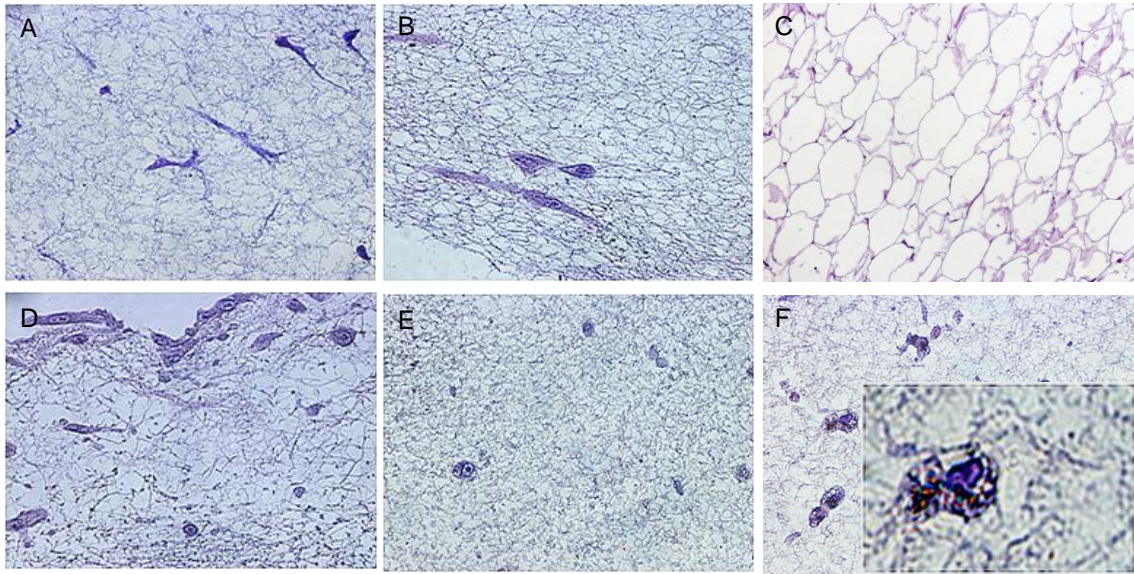


Figura 27. Tinción con hematoxilina-eosina. 20x. Diferenciación adipogénica del modelo HFA-Tdm. **A, B y C:** Grupos control. **A:** Fibroblastos orales humanos inducidos por 20 días a tejido adiposo. **B:** ASCs cultivadas en medio basal sin factores de inducción. **C:** Tejido adiposo unilocular. **D, E y F:** HFA-Tdm inducidos al linaje adipogénico por 24 horas, 10 y 20 días respectivamente.

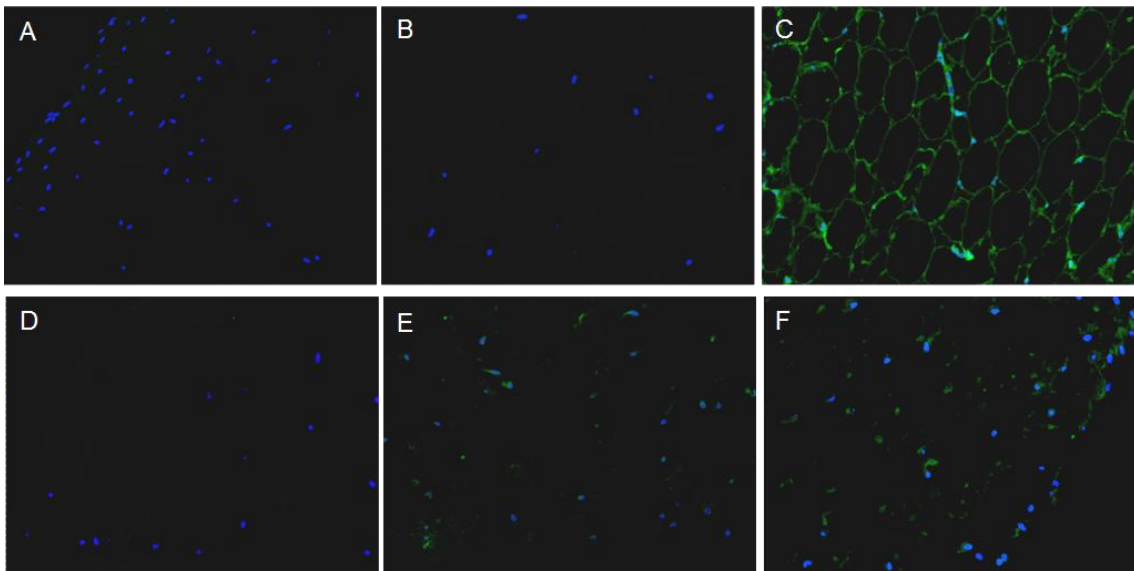


Figura 28. Inmunofluorescencia para leptina con DAPI. Diferenciación de HFA-Tdm hacia el linaje adipogénico. 20x. **A, B y C:** Grupos control. **A:** Fibroblastos orales humanos inducidos por 20 días a tejido adiposo. **B:** ASCs cultivadas en medio basal sin factores de inducción. **C:** Tejido adiposo unilocular. **D, E y F:** HFA-Tdm inducidos al linaje adipogénico por 24 horas, 10 y 20 días respectivamente.

5. INDUCCIÓN A LA ESTIRPE NEUROGÉNICA:

La tinción de HyE de los cultivos CCA-Bdm inducidos al linaje neurogénico, revelaron que el proceso de transdiferenciación inició después de veinticuatro horas de inducción, con un 31% de células con desarrollo de prolongaciones citoplasmáticas que parecían procesos rudimentarios muy parecidos a los axones y con el 43,42% mostrando una expresión de nestina por inmunofluorescencia (Figura 29 y Cuadro 1). Cuando las células fueron incubadas en el medio neurogénico durante diez y veinte días, el 44% de las células mostraron largas prolongaciones axonales así como extensiones celulares pequeña de tipo dendrítico con un 57,34% de las células positivas a nestina para el día diez y el 85,71% para las células a los veinte días.

El análisis de los tejidos HFA-Tdm bio-*generados* por ingeniería tisular e inducidos reveló que el 50% de las células mostraron modificaciones morfológicas significativas muy parecidas a los procesos de las células precursoras de neuronas transdiferenciadas luego de veinticuatro horas de inducción con un 78,8% de las células expresando a la proteína nestina por inmunofluorescencia (Figuras 30, 31 y Cuadro 2). Después, la inducción para los diez días resultó en un 55,6% de células tipo neuronal y un 85,3% de las células con expresión de nestina, mientras que los tejidos incubados por veinte días en el medio inductor fueron capaces de generar el 60% de células precursoras de neuronas y un 95,74% de células expresando la proteína nestina. Todos los porcentajes de expresión de nestina fueron significativamente mayores en los cultivos HFA-Tdm que en los cultivos CCA-Bdm, con los principales cambios morfológicos sólo después de los veinte días de inducción (Cuadro 3).

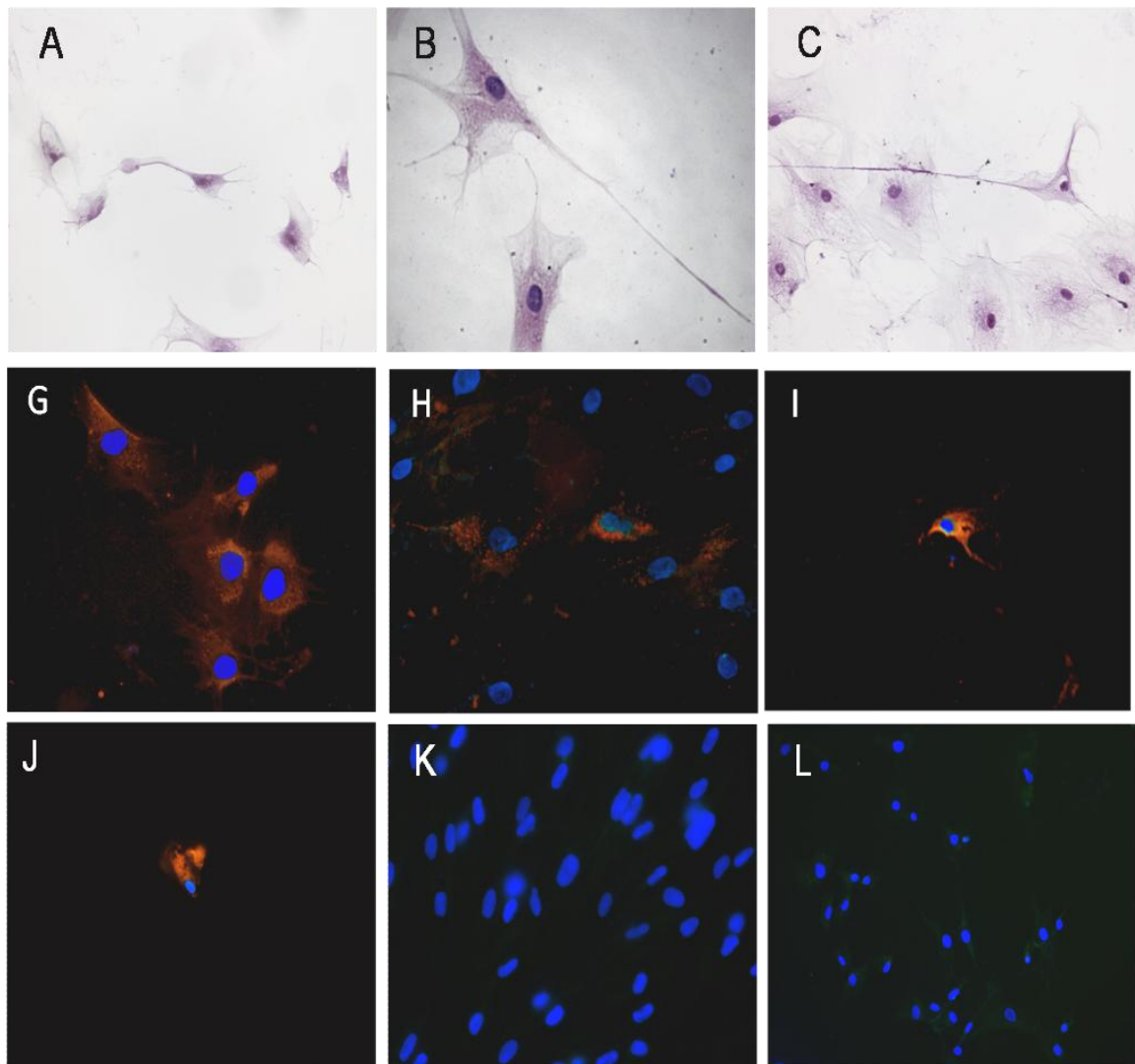


Figura 29. Diferenciación de las ASCs en el modelo bidimensional hacia el linaje neurogénico. 20x. **A, B y C:** hematoxilina-eosina en ASCs cultivadas por 24 horas, 10 días y 20 días, respectivamente. **D, E y F:** Inmunofluorescencia para nestina en ASCs inducidas por 24 horas, 10 días y 20 días, respectivamente. **G, H e I:** Inmunofluorescencia para nestina con DAPI. **G:** Inmunoreactividad de la línea celular SNK. **H:** Fibroblastos de mucosa oral control incubados en medio neurogénico. **I:** Inmunofluorescencia de ASCs no inducidas.

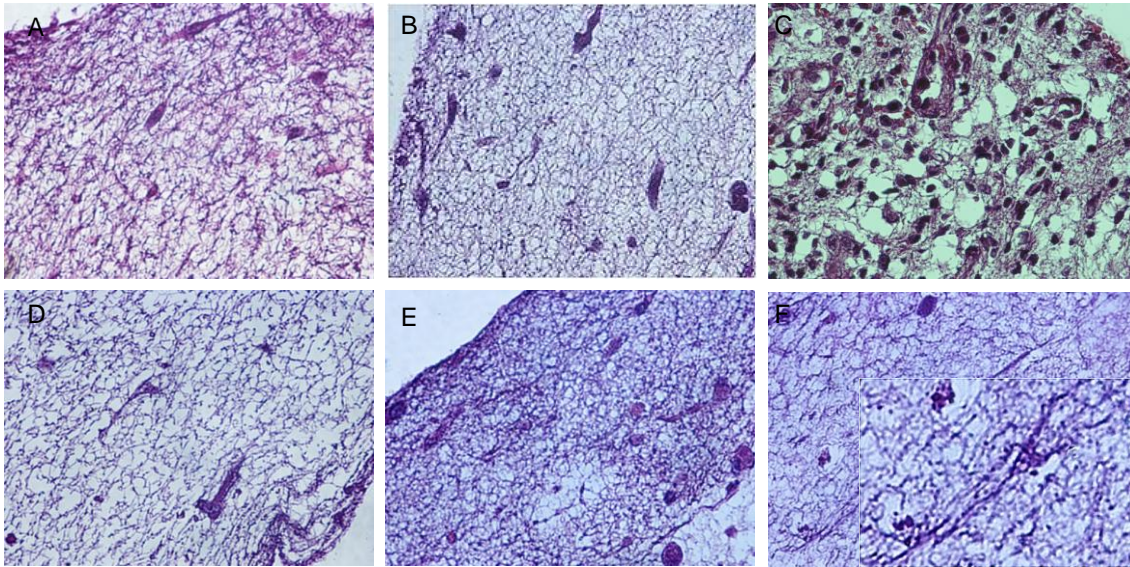


Figura 30. Tinción con hematoxilina-eosina. 20x. Diferenciación neurogénica del modelo HFA-Tdm. **A, B, y C:** Grupos control. **A:** Fibroblastos orales humanos inducidos por 20 días a tejido nervioso. **B:** ASCs cultivadas en medio basal sin factores de inducción. **C:** Tejido encefálico. **D, E y F:** HFA-Tdm inducidos al linaje neurogénico por 24 horas, 10 y 20 días respectivamente.

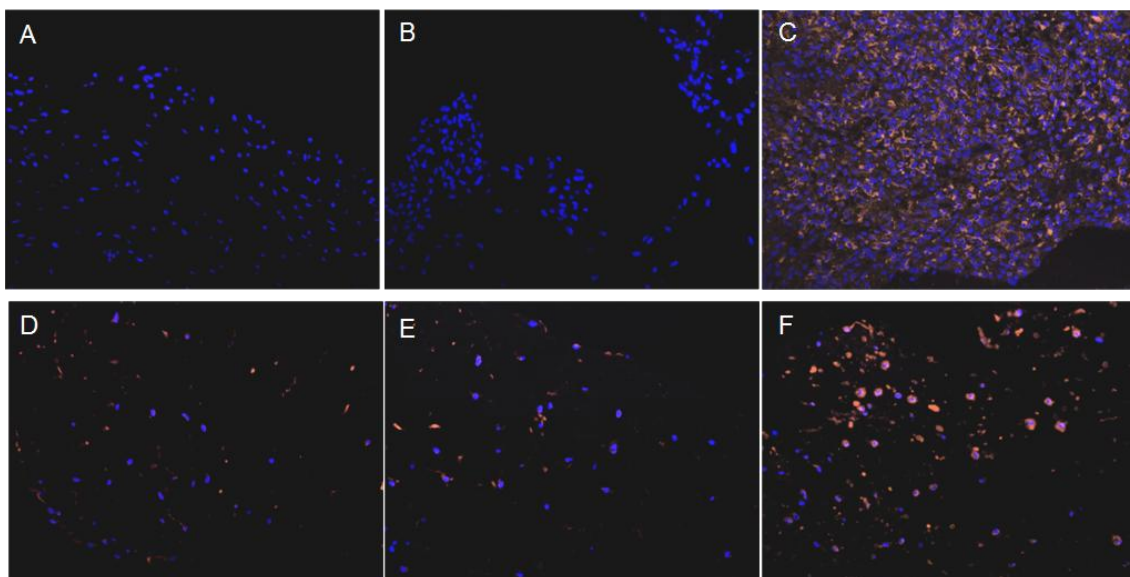


Figura 31. Inmunofluorescencia para nestina con DAPI. Diferenciación de HFA-Tdm hacia el linaje neurogénico. 20x. **A, B y C:** Grupos control. **A:** Fibroblastos orales humanos inducidos por 20 días a tejido nervioso. **B:** ASCs cultivadas en medio basal sin factores de inducción. **C:** Tejido encefálico humano. **D, E y F:** HFA-Tdm inducidos al linaje neurogénico por 24 horas, 10 y 20 días respectivamente.

Cuadro 1. Porcentaje de transdiferenciación positiva de ASCs en los cultivos *bidimensionales* (CCA-Bdm) hacia los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y neurogénico mostrado por tinción histológica con rojo alizarín S, azul alcian, oil red O y hematoxilina y eosina y por inmunofluorescencia para fosfatasa alcalina, colágeno tipo II, leptina y nestina después de 24 horas, 10 días y 20 días de inducción.

CCA-Bdm	INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA		INDUCCIÓN CONDRÓGENICA		INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA		INDUCCIÓN NEUROGÉNICA	
	Rojo alizarín S	Fosfatasa alcalina	Azul alcian	Colágeno tipo II	Oil red O	Leptina	Hematoxilina-eosina	Nestina
24 horas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	31,00	43,42
10 días	5,24	6,26	84,08	92,34	0,00	90,50	44,00	57,34
20 días	47,29	40,6	94,94	93,00	33,33	98,10	44,00	85,71

Cuadro 2. Porcentaje de transdiferenciación positiva de ASCs en el modelo de cultivo *tridimensional* (HFA-Tdm) hacia los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y neurogénico mostrado por tinción histológica con rojo alizarín S, azul alcian, oil red O y hematoxilina y eosina y por inmunofluorescencia para fosfatasa alcalina, colágeno tipo II, leptina y nestina después los diferentes periodos de inducción.

HFA-Tdm	INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA		INDUCCIÓN CONDRÓGENICA		INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA		INDUCCIÓN NEUROGÉNICA	
	Rojo alizarín S	Fosfatasa alcalina	Azul alcian	Colágeno tipo II	Oil red O	Leptina	Hematoxilina-eosina	Nestina
24 horas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	50,00	78,80
10 días	7,60	93,80	14,80	80,00	0,00	87,00	55,60	85,30
20 días	74,56	100,00	98,70*	86,70	92,30	87,90	60,00	95,74

Cuadro 3. Comparación estadística de los porcentajes de transdiferenciación de ASCs en el modelo *bidimensional* frente al *tridimensional* (CCA-Bdm y HFA-Tdm) hacia los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y neurogénico obtenidos tras la aplicación de distintos métodos (tinción histológica con rojo alizarín S, azul alcian, oil red O, hematoxilina-eosina e inmunofluorescencia para fosfatasa alcalina, colágeno tipo II, leptina y nestina) después 24 horas, 10 días y 20 días del periodo de inducción. Todos los valores corresponden a niveles de significación p para el test exacto de Fisher. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están remarcados en color verde.

CCA-Bdm vs. HFA-Tdm	INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA		INDUCCIÓN CONDRÓGENICA		INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA		INDUCCIÓN NEUROGÉNICA	
	Rojo alizarín S	Fosfatasa alcalina	Azul alcian	Colágeno tipo II	Oil red O	Leptina	Hematoxilina-eosina	Nestina
24 horas	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0093	0,0000
10 días	0,5679	0,0000	0,0000	0,0236	1,0000	0,5149	0,1196	0,0000
20 días	0,0000	0,0000	0,2116	0,2380	0,0000	0,0101	0,0335	0,0238

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS CULTIVOS CCA-BdmTRANS-DIFERENCIADOS:

El análisis de expresión genética de los cultivos CCA-Bdm inducidos al linaje osteogénico durante veinte días mostró una sobreexpresión significativa de varios genes relacionados con la diferenciación osteogénica y función ósea (más del 20% de expresión incrementada respecto al grupo control), incluyendo *ALPL*, *BGLAP*, *BMP15*, *BMP3*, *BMP6*, *BMP7*, *BMP8B* y *BMPR1B* (Cuadro 4). Además los genes *BMP8A* y *BMPER* y *BMPR1A* mostraron una expresión génica aumentada que fue menor del 20%. Así mismo, la expresión de algunos genes disminuyó tras la inducción osteogénica incluyendo *BMP1*, *BMP10*, *BMP2*, *BMP4*, *BMP5* y *BMP8A*.

El análisis de expresión génica de los cultivos CCA-Bdm inducidos al linaje condrogénico después de veinte días de inducción mostró la sobre expresión de los genes *BGN*, *CHAD*, *CHSY1*, *CHSY3*, *CILP*, *CILP2*, *COL10A1*, *COL11A1*, *COL2A1*, *CSGALNACT2*, *HAS1* y *HAS2* (Cuadro 4), mientras que *COL11A2*, *COL6A1* y *COL6A3* mostraron un incremento en la expresión génica menor del 20% y algunos genes como *ACAN*, *COL6A2*, *COL6A6*, *COL9A1*, *COL9A2*, *COL9A3* y *HAS3* disminuyeron su expresión luego del proceso de inducción condrogénico.

De forma similar, CCA-Bdm incubados en medio adipogénico mostraron una clara sobre expresión (más del 20% respecto a los controles) de los genes *ACACB*, *ADFP*, *ADIPOQ*, *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *CFD*, *DGAT2*, *FAB1*, *FAB4*, *FAB7*, *FADS1*, *FADS2*, *FADS3*, *GPAM*, *GPD1*, *LBP*, *LEP*, *LEPROT*, *LEPROLT1*, *LPIN1*, *LPIN3*, *LPL*, *PLIN* y *PNPLA3* con dos genes bajo expresados después del proceso de inducción *LPIN2* y *RETN* (Cuadro 4).

Finalmente, después de la inducción de CCA-Bdm al linaje neurogénico, el análisis de expresión de genes mediante microarrays reveló que varios genes relacionados al desarrollo y diferenciación neurogénica se sobre expresaron en 20% incluyendo: *DDN*, *HNT*, *NAV1*, *NAV2*, *NAV3*, *NCAN*, *NEFH*, *NEFL*, *NEGR1*, *NEUROD1*, *NEUROD2*, *NEUROD6*, *NEUROG1*, *NEUROG2*, *NGFR*, *NRCAM*, *SLC6A2*, *SLC6A4* y *SLC6A9*. En contraste, *NCAM1*, *NEUROD4* y *SLC6A11* mostraron un incremento en la expresión génica menor del 20% y los genes *NCAM2*, *NEFM*, *NEUROG3*, *NGF*, *NGFRAP1*, *SLC32A1*, *SLC6A13* y *SLC6A8* disminuyeron su expresión después de la inducción al linaje neurogénico (Cuadro 4).

Cuadro 4. El análisis de la expresión genética de las ASCs control y de las ASCs transdiferenciadas a los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y neurogénico fue determinado por microarray. *Gen ID:* Referencia de Affimetrix del gen específico. *FC BONE/CTR:* Doblaje en la expresión de las células inducidas al linaje osteogénico frente a las ASCs controles. *FC CART/CTR:* Doblaje en la expresión de las células inducidas al linaje condrogénico frente a las ASCs controles. *FC ADIPO/CTR:* Doblaje en la expresión de las células inducidas al linaje adipogénico frente a las ASCs controles. *NEURO/CTR:* Doblaje en la expresión de las células inducidas al linaje neurogénico frente a las ASCs controles. Los genes que mostraron una sobre-expresión considerable (mayor del 20%) después del periodo de inducción hacia los diferentes linajes está remarcado en rojo.

Gene ID	FC CART/CTR	FC BONE/CTR	FC NEURO/CTR	FC ADIPO/CTR	Símbolo de gen	Nombre del gen
1557924_s_at//215783_s_at	0,71	1,55	1,33	1,38	ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
206956_at	0,96	1,29	0,80	1,06	BGLAP	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein
1570383_at//202701_at//1569002_x_at//205574_x_at//206725_x_at//207595_s_at//1569001_at	1,00	0,62	0,88	0,79	BMP1	bone morphogenetic protein 1
208292_at	1,01	0,59	1,55	0,81	BMP10	bone morphogenetic protein 10
221332_at	2,37	1,89	1,74	1,52	BMP15	bone morphogenetic protein 15
205290_s_at//205289_at	0,50	0,26	0,63	0,22	BMP2	bone morphogenetic protein 2
208244_at	4,90	1,90	0,60	9,90	BMP3	bone morphogenetic protein 3
211518_s_at	0,07	0,05	0,08	0,06	BMP4	bone morphogenetic protein 4
205431_s_at//205430_at	0,38	0,83	0,71	0,59	BMP5	bone morphogenetic protein 5
241141_at//206176_at//215042_at	1,18	2,50	1,34	1,26	BMP6	bone morphogenetic protein 6
211260_at//209591_s_at	1,42	2,26	1,51	1,87	BMP7	bone morphogenetic protein 7
207866_at//220203_at//220204_s_at	1,44	0,77	0,82	1,10	BMP8A	bone morphogenetic protein 8a
221615_at	0,88	1,01	0,90	1,05	BMP8A /// BMP8B	bone morphogenetic protein 8a /// bone morphogenetic protein 8b
235275_at//207865_s_at	0,82	2,55	0,68	0,76	BMP8B	bone morphogenetic protein 8b
241986_at	0,11	1,13	0,41	1,08	BMPER	BMP binding endothelial regulador
204832_s_at//213578_at	1,09	1,12	1,13	0,76	BMPR1A	bone morphogenetic protein receptor, type IA
229975_at//242579_at	1,83	2,83	2,35	0,77	BMPR1B	bone morphogenetic protein receptor, type IB
1554950_at//217161_x_at//207692_s_at//205679_x_at	0,63	0,54	0,90	1,11	ACAN	Aggrecan
201262_s_at//213905_x_at//201261_x_at	13,70	0,42	3,47	0,45	BGN	Biglycan
206869_at	2,15	0,30	1,00	0,85	CHAD	Chondroadherin
205567_at//203044_at	1,85	1,71	1,37	3,06	CHSY1	chondroitin sulfate synthase 1

Resultados

242100_at	1,67	0,82	1,35	1,69	CHSY3	chondroitin sulfate synthase 3
206227_at	5,43	0,48	1,40	1,06	CILP	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase
1552289_a_at//1552288_at	11,27	0,55	1,15	0,77	CILP2	cartilage intermediate layer protein 2
217428_s_at//205941_s_at	24,69	1,82	1,69	0,66	COL10A1	collagen, type X, alpha 1
229271_x_at//37892_at//204320_at	10,72	2,37	4,53	6,04	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1
213870_at//216993_s_at	1,08	1,03	1,03	1,06	COL11A2	collagen, type XI, alpha 2
217404_s_at//213492_at	6,32	1,81	2,09	2,22	COL2A1	collagen, type II, alpha 1
212940_at//214200_s_at//212938_at//212937_s_at//213428_s_at//212091_s_at//216904_at//212939_at	1,04	1,39	0,96	1,09	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1
209156_s_at//213290_at	0,90	1,17	0,93	0,84	COL6A2	collagen, type VI, alpha 2
201438_at	1,02	0,94	0,99	0,83	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3
230867_at	0,25	0,43	0,44	0,18	COL6A6	collagen type VI alpha 6
1555527_at//222008_at	0,88	1,05	2,09	1,24	COL9A1	collagen, type IX, alpha 1
232542_at//213622_at	0,46	0,53	1,09	0,78	COL9A2	collagen, type IX, alpha 2
204724_s_at	0,85	0,35	0,30	0,45	COL9A3	collagen, type IX, alpha 3
222235_s_at//218871_x_at//239077_at	1,50	0,85	1,24	0,80	CSGALNACT2	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2
207316_at	8,63	0,70	1,73	5,15	HAS1	hyaluronan synthase 1
230372_at//206432_at	23,60	4,19	1,65	9,28	HAS2	hyaluronan synthase 2
223541_at//228179_at//1552980_at	0,90	0,90	0,70	0,38	HAS3	hyaluronan synthase 3
214788_x_at	0,73	1,53	1,73	1,33	DDN	Dendrin
227566_at//222020_s_at//241934_at	10,74	0,55	2,88	1,34	HNT	Neurotrimin
233567_at//233870_at//224774_s_at//227584_at//224771_at//224770_s_at//224773_at//224772_at	2,87	1,66	1,69	1,28	NAV1	neuron navigator 1
1567357_at//222599_s_at//1556606_at//1567358_at//218330_s_at//222598_s_at	0,93	1,68	1,22	1,71	NAV2	neuron navigator 2
1552658_a_at//1562234_a_at//204823_at//216632_at//216466_at	1,55	1,04	1,52	1,81	NAV3	neuron navigator 3
214952_at//229799_s_at//231532_at//212843_at//217359_s_at//227394_at//209968_s_at	0,84	0,77	1,01	0,80	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
205669_at//232390_at	0,30	0,95	0,83	1,12	NCAM2	neural cell adhesion molecule 2
205143_at	0,78	2,56	2,61	5,06	NCAN	Neurocan
204412_s_at//33767_at	1,27	3,04	1,54	2,72	NEFH	neurofilament, heavy polypeptide
221805_at//221801_x_at//221916_at//	2,06	4,63	2,87	8,52	NEFL	neurofilament, light polypeptide

Resultados

205113_at//223902_at	0,82	0,99	0,84	1,38	NEFM	neurofilament, medium polypeptide
1553194_at//229461_x_at//243357_at//239548_at	3,19	6,39	2,72	8,07	NEGR1	neuronal growth regulator 1
1556057_s_at//206282_at	0,62	2,64	2,84	1,02	NEUROD1	neurogenic differentiation 1
210271_at//1552953_a_at	6,21	1,44	2,10	2,17	NEUROD2	neurogenic differentiation 2
221318_at	1,34	0,31	1,14	0,80	NEUROD4	neurogenic differentiation 4
220045_at	1,50	0,50	1,21	2,43	NEUROD6	neurogenic differentiation 6
208497_x_at	2,88	7,12	5,35	8,94	NEUROG1	neurogenin 1
215632_at	1,17	1,17	2,17	2,67	NEUROG2	neurogenin 2
207965_at	1,37	0,24	0,31	0,31	NEUROG3	neurogenin 3
206814_at	0,61	0,15	0,76	0,49	NGF	nerve growth factor (beta polypeptide)
205858_at	3,60	41,60	4,40	108,40	NGFR	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
217963_s_at	0,86	1,23	0,99	1,11	NGFRAP1	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1
204105_s_at//216959_x_at	2,02	5,44	3,12	13,69	NRCAM	neuronal cell adhesion molecule
240532_at	0,70	6,90	0,80	1,10	SLC32A1	solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1
1554724_at	9,20	1,40	1,20	1,80	SLC6A11	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11
237058_x_at	1,05	0,67	0,82	0,78	SLC6A13	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13
217213_at//215715_at//217214_s_at//210353_s_at//	2,18	0,69	1,48	2,43	SLC6A2	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2
207519_at	2,71	2,06	2,46	0,94	SLC6A4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4
210854_x_at//202219_at//213843_x_at//	2,12	1,27	0,91	3,08	SLC6A8	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8
207043_s_at	1,08	0,26	1,25	0,49	SLC6A9	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
214584_x_at//221928_at//49452_at//1552616_a_at//1552615_at//43427_at	0,81	1,89	1,79	51,50	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta
215895_x_at//209122_at	0,42	0,73	0,95	1,67	ADFP	adipose differentiation-related protein//Adipophilin
207175_at	0,30	9,02	6,36	556,21	ADIPOQ	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
217748_at	1,28	1,12	0,88	1,33	ADIPOR1	adiponectin receptor 1
201346_at	1,35	1,03	0,64	1,76	ADIPOR2	adiponectin receptor 2
205382_s_at	0,10	1,57	0,93	3,54	CFD	complement factor D (adipsin)
224327_s_at//226064_s_at	0,18	1,32	1,31	52,07	DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)
205892_s_at//231693_at	0,78	1,37	1,87	1,28	FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver, mRNA (cDNA clone IMAGE:4712653)//fatty acid binding protein 1, liver
235978_at//203980_at	0,97	16,05	8,22	924,05	FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
205029_s_at//205030_at//216192_at	1,72	1,55	2,69	10,84	FABP7	fatty acid binding protein 7, brain
208964_s_at//208963_x_at//208962_s_at	0,75	1,59	1,29	5,72	FADS1	fatty acid desaturase 1
202218_s_at//243953_at	1,80	2,26	1,34	3,44	FADS2	fatty acid desaturase 2

Resultados

204257_at//216080_s_at	1,29	1,51	1,22	3,43	FADS3	fatty acid desaturase 3
225420_at//225424_at	3,23	1,66	2,03	44,32	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
204997_at//213706_at	1,00	7,45	2,20	997,93	GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)
214461_at	0,16	3,69	0,25	92,41	LBP	lipopolysaccharide binding protein
207092_at	13,20	70,20	6,10	19,80	LEP	Leptin
227095_at//202378_s_at	0,82	1,24	1,30	1,44	LEPROT	leptin receptor overlapping transcript
202595_s_at	1,90	1,15	1,34	1,49	LEPROTL1	leptin receptor overlapping transcript-like 1
212276_at//212274_at//212272_at	0,36	0,93	0,98	2,82	LPIN1	lipin 1
202460_s_at//202459_s_at	0,88	1,09	0,81	0,95	LPIN2	lipin 2
232966_at	1,25	1,35	1,15	1,75	LPIN3	lipin 3
203549_s_at//203548_s_at	0,21	9,52	4,08	438,95	LPL	lipoprotein lipase
205913_at	0,82	24,24	5,82	1879,94	PLIN	Perilipin
220675_s_at//233030_at	0,45	7,82	1,74	59,95	PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing 3
220570_at	0,40	0,31	0,19	0,13	RETN	Resistin

DISCUSIÓN

La generación de tejidos artificiales empleando células troncales adultas y biomateriales altamente compatibles, es uno de los principales objetivos en la investigación biomédica. Aunque estos tejidos *bio-generados* mediante ingeniería tisular pudieran ser potencialmente útiles para la sustitución clínica de tejidos dañados, la obtención de células nativas con elevada capacidad de proliferación y diferenciación no es siempre posible (De Ugarte *et al.*, 2003). Por esta razón, la búsqueda de fuentes celulares alternativas para su utilización como sustitutos de las células nativas es uno de los retos actuales en esta área (Zavan B. *et al.*, 2010).

En este contexto, las ASCs son una de las fuentes celulares de células troncales mesenquimales adultas más prometedoras (De Ugarte *et al.*, 2003; Zuk *et al.*, 2002) con elevadas capacidades de proliferación y diferenciación (De Ugarte *et al.*, 2003; Schaffler y Buchler, 2007). Una de las propiedades de estas células es su fácil acceso y la posibilidad de obtener diferentes tipos de células a partir de una fuente celular pluripotencial única. Aunque la potencialidad de las ASCs cultivadas en sistemas bidimensionales ha sido previamente establecida (Guilak *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2008), se conoce poco acerca del fenotipo y la potencialidad de diferenciación de estas células en sistemas de cultivo tridimensionales (Duggal *et al.*, 2009; Mauney *et al.*, 2007), en los que las células reproducen su distribución a la estructura natural de los tejidos nativos. Por esta razón, en esta tesis doctoral hemos comparado el comportamiento de las ASCs cultivadas en un modelo bidimensional con otro tridimensional usando biomateriales compuestos por fibrina y agarosa, los cuales han sido descritos previamente por nuestro grupo de investigación, habiendo demostrado una gran eficacia en la elaboración de constructos tridimensionales biocompatibles (Alaminos *et al.*, 2006 y 2007; Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009). Idealmente, un buen biomaterial debe de servir para funcionar como un sustrato celular (Hutmacher *et al.*, 2001; Trubiani *et al.*, 2008; Behravesch *et al.*, 1999; Ishaug *et*

al., 1997; Neuss *et al.*, 2008; Munirah *et al.*, 2008), que guie la diferenciación y la proliferación de las células participantes en el constructo (Hutmacher *et al.*, 2001). Sin embargo, la influencia de los biomateriales compuestos por fibrina y agarosa en la capacidad de diferenciación de las ASCs no ha sido establecida hasta la fecha.

En este contexto, nuestros resultados demostraron que las ASCs cultivadas en modelos bidimensionales pueden ser eficientemente transdiferenciadas a varios tipos celulares. Este hecho no sólo fue confirmado por análisis histológico, sino también por análisis histo-químico, de inmunofluorescencia y a través de la expresión de RNAm determinado por microarrays. Además, nuestros análisis confirmaron la plasticidad celular de las ASCs cuando fueron sometidas a medio inductor osteogénico, condrogénico, adipogénico y neurogénico en los cultivos tridimensionales. Sorprendentemente, el potencial de transdiferenciación de las ASCs sometidas en los cultivos tridimensionales fue comparable o tal vez mayor que para los cultivos bidimensionales, exceptuando la inducción condrogénica que sólo se alcanzó con claridad a los veinte días. Estos resultados sugieren que el modelo de cultivo tridimensional de fibrina y agarosa permite la diferenciación de las células ASCs y que la generación de sustitutos tisulares humanos tridimensionales empleando ASCs es una técnica eficaz que podría ser de utilidad en los protocolos de terapia celular y tisular.

Cuando se analizaron las ASCs que se indujeron a la estirpe osteogénica, observamos que un alto porcentaje de células adquirieron un fenotipo osteogénico después de 20 días de inducción, especialmente en el sistema de cultivo tridimensionales. Aunado al análisis histológico y la expresión génica de las ASCs cultivadas en modelos bidimensionales se observó que un alto número de genes relacionados con funciones y desarrollo óseo estaban sobreexpresados a los veinte días de inducción. Estos resultados sugieren que las células transdiferenciadas a precursoras de osteoblastos no sólo desarrollaron una morfología compatible con las células óseas como

observaron Zuk *et al.*, Guilak *et al.* y Matsumoto *et al.* en cultivos bidimensionales (Zuk *et al.*, 2002; Guilak *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2008), sino que también tuvieron un comportamiento similar desde el punto de vista genético; todo ello indica que dicha transdiferenciación podría ser potencialmente útil para su uso clínico en el ámbito de la cirugía maxilofacial. En contraste, otros genes relacionados con tejido óseo no mostraron niveles considerables de sobreexpresión, tal vez debido a que las células se indujeron sólo durante veinte días o tal vez por la carencia de señales óseas específicas *in situ* que podrían desarrollarse en un ambiente *in vivo*. Las futuras investigaciones *in vivo* utilizando modelos tridimensionales podrán añadir sin duda nueva información sobre la expresión genética de las ASCs inducidas y transdiferenciadas.

Por otro lado, cuando se evaluó la transdiferenciación de las ASCs a la estirpe cartilagénica, se encontró que ambos modelos, el bidimensional y el tridimensional pudieron sintetizar grandes cantidades de mucopolisacáridos y colágeno tipo II si bien, el fenotipo condrogénico se alcanza antes en el modelo bidimensional que en el tridimensional. Así mismo, la expresión genética por microarrays de CCA-Bdm confirmó que varios genes relacionados con la estirpe cartilagénica se sobreexpresaron tras del proceso de inducción incluyendo: *BGN*, *CHAD*, *CHSY1*, *CHSY3*, *CILP*, *CILP2*, *COL10A1*, *COLL11A1*, *CSGALNACT2*, *HAS1*, *HAS2* y *COL2A1*. El gen *COL2A1*, ha sido reportado en estudios previos como un marcador importante en las células troncales inducidas a cartílago (Guilak *et al.*, 2006; Mehlhorn *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2008). En contraste, algunos genes que codifican isoformas de colágeno y el gen *HAS3* mostraron una baja expresión tras la inducción condrogénica. Esta disminución en la expresión génica podría deberse a que sería necesario un ambiente de tipo *in vivo* o a que es necesario mantener el periodo de inducción durante más tiempo *ex vivo*, lo que podría provocar una sobreexpresión de ciertos tipos de genes. Estos datos sugieren que las ASCs inducidas al linaje

condrogénico tienen un comportamiento muy similar a las que conforman el cartílago nativo y por ello pueden ser altamente útiles en medicina regenerativa.

De manera similar, las ASCs inducidas a células precursoras de adipocitos, mostraron altos niveles de sobreexpresión génica de RNAm para la mayoría de los genes relacionados al linaje adipogénico. Ciertamente, el 92% de los genes relacionados con tejido adiposo analizados en este trabajo, se sobreexpresaron después de la inducción. Posiblemente, esto fue debido a que las ASCs residen en el tejido adiposo y aún después de ser aisladas y cultivadas *in vitro*, pudieron mantener una gran cantidad de factores de crecimiento o señalizaciones de tipo intra/extracelular que facilitaron su diferenciación una vez que el medio adipogénico fue suministrado a los cultivos *in vitro*. Así mismo, el análisis de oligonucleótidos mediante microarrays reveló que la sobre expresión génica fue alta para varios genes, incluyendo: *ADIPOQ*, *FABP4*, *GPD1*, *LPL* y *PLIN*, los cuales son esenciales para la diferenciación y función de adipocítica (Suga *et. al.*, 2009; De Rosa *et al.*, 2009; Noer *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque la tinción con oil red O mostró que los cultivos bidimensionales y tridimensionales no contenían ningún contenido triglicérico antes de los veinte días de inducción. Una expresión significativa de leptina-OB estaba presente desde el día diez. Todos estos resultados sugieren que las ASCs tienen un alto potencial para diferenciarse a células precursoras de adipocitos en un ambiente *ex vivo* y que podrían ser altamente útiles en medicina regenerativa.

En relación a la inducción neurogénica, los cultivos bidimensionales sobreexpresaron un 63% de los genes relacionados a la estirpe neurogénica después de los veinte días de inducción, incluyendo entre otros: *NEUROD6*, *NEUROG1*, *NEUROG2* y el factor receptor de crecimiento neural *NGFR*. Las células inducidas en ambos modelos de cultivo, bidimensionales y tridimensionales, mostraron cambios morfológicos importantes incluyendo la formación de procesos axonales muy similares a los neuronales, así como la formación de procesos dentríticos rudimentarios en la

membrana celular a tan sólo veinticuatro horas del proceso de inducción. Estos hallazgos coinciden con la sobre expresión de los genes que son específicos para el desarrollo neuronal, incluyendo varios tipos de neurofilamentos como los polipéptidos pesados y ligeros, la adhesión de la molécula neural celular *NRCAM* y el gen que corresponde a *dendrin*, que tiene un rol importante en el desarrollo de las dendritas neuronales (Neuner-Jehle *et al.*, 1996). De acuerdo con la expresión de la proteína nestina determinada por inmunofluorescencia, ambos modelos de cultivo, los bidimensionales y los tridimensionales, mostraron inmunoreactividad en la mayoría de las células (>85%) expresando nestina tras veinte días de inducción. El potencial de uso clínico de células precursoras neuronales autólogas desarrollado en ambos modelos de células troncales adultas parece ser en consecuencia ilimitado.

Una de las mayores ventajas de los métodos descritos es su simplicidad, la rapidez de inducción para la transdiferenciación y el hecho de que un solo tipo celular se ha utilizado para la generación de varios tipos de tejido adulto. De esta manera, utilizando medios de cultivo específicos, las ASCs pudieron ser eficientemente diferenciadas a células precursoras de adipocitos en los modelos bidimensionales y tridimensionales después de veinte días de cultivo. La transdiferenciación a células precursoras neuronales y cartilaginosas después de diez y veinte días, respectivamente y hacia células precursoras de hueso después de veinte días. Otra ventaja de la metodología empleada es que no implica ninguna manipulación genética de las células. Así, la posibilidad de inducir una alteración genómica severa con potencial oncogénico es muy baja.

En resumen, en este trabajo de tesis doctoral se ha demostrado que las células ASCs son altamente accesibles obtenidas a partir de tejido adiposo y que son una fuente celular para su uso en ingeniería tisular con alto potencial de diferenciación en ambos sistemas de cultivo, el bidimensional y el tridimensional. El empleo de los constructos

de fibrina agarosa mostró resultados de alta biocompatibilidad comparable y con mayor eficiencia que la transdiferenciación celular *ex vivo*.

La utilidad de estos resultados en el área maxilofacial, resulta evidente al conformar los tejidos obtenidos a partir de la ASCs, el conjunto de tejidos básicamente implicados en la patología y restauración terapéutica y plástica de dicha región.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se infieren las siguientes conclusiones:

1. Los métodos y técnicas desarrollados en la presente tesis doctoral permiten el aislamiento y expansión de las células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo y su mantenimiento hasta el séptimo subcultivo, sin que dicho aislamiento y mantenimiento hayan generado alteraciones artefactuales significativas.
2. Las células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo en cultivo bidimensional, poseen una elevada capacidad de transdiferenciación a las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica, lo que implica la posibilidad de su utilización en terapia celular.
3. Las células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo en cultivos tridimensionales basados en biomateriales de fibrina y agarosa, poseen una elevada capacidad de transdiferenciación a las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica, lo que implica la posibilidad de su utilización en terapia sustitutiva de órganos y tejidos.
4. El análisis histológico e histoquímico de las células humanas mesenquimales derivadas de tejido adiposo transdiferenciadas en cultivos bidimensionales a las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica, pone de relieve la presencia de marcadores histoquímicos específicos de cada una de dichas estirpes, lo que confirma el carácter ortotípico de la transdiferenciación, si bien existen diferencias en relación con el porcentaje de células transdiferenciadas y la cronología de la transdiferenciación.
5. El análisis histológico e histoquímico de las células humanas mesenquimales derivadas de tejido adiposo transdiferenciadas en cultivos tridimensionales basados en biomateriales de fibrina y agarosa a las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica, pone de relieve la presencia de marcadores histoquímicos específicos de cada una de dichas estirpes, lo que confirma la naturaleza ortotípica del tejido transdiferenciado, si bien existen diferencias en los distintos tejidos en relación con el porcentaje de células transdiferenciadas y la cronología de la transdiferenciación.

6. El estudio comparado de la transdiferenciación de las células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo en cultivos bidimensionales y tridimensionales basados en biomateriales de fibrina y agarosa hacia las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica, pone de relieve la eficacia del proceso de transdiferenciación en ambos modelos, si bien la transdiferenciación osteogénica, adipogénica y neurogénica alcanza mayor eficacia en el modelo tridimensional.
7. El análisis de expresión génica mediante microarray de las células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo transdiferenciadas a las estirpes osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica, pone de relieve la expresión de funciones génicas vinculadas con el fenotipo de cada una de las estirpes. Dicha expresión se correlaciona con la identificación de los marcadores histológicos e histoquímicos identificados asimismo en cada una de ellas.

***REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Alaminos M., Sanchez-Quevedo M.C., Munoz-Avila J.I., Serrano D., Medialdea S., Carreras I., Campos A. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47: 3311-17.

Alaminos M., Sanchez-Quevedo M.C., Munoz-Avila J.I., Garcia J.M., Crespo P.V., Gonzalez-Andrades M., Campos A. (2007). Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe x-ray microanalysis. *J. Cell. Physiol.*, 211: 692-98.

Alaminos M., Garzón I., Sánchez-Quevedo M.C., Moreu G., González-Andrades M., Fernandez-Montoya A., Campos A. (2007). Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1: 350-9.

Alaminos M., Pérez-Köhler B., Garzón I., García-Honduvilla N., Romero B., Campos A., Buján J. (2010). Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* Feb 8, in press.

Atala A. (2008). Advances in tissue and organ replacement, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 3: 21-31.

Awad H.A., Wickham M.Q., Leddy H.A., Gimble J.M., Guilak F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 25: 3211-22.

Behravesch E., Yasko A.W., Engel P.S., Mikos A.G. (1999). Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 367(S): 118-29.

Bianco P., Riminucci M., Kuznetsov S., Robey P.G. (1999). Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, 9: 159-73.

Bruder S.P., Fox B.S. (1999). Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, S: 68-83.

Bumgardner J.D., Wiser R., Gerard P.D., Bergin P., Chestnutt B., Marin M., Ramsey V., Elder S.H., Gilbert J.A. (2003). Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 14(5), 423-38.

B Malafaya P.P., Pedro A.J., Peterbauer A., Gabriel C., Redl H., Reis R.L. (2005). Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue

engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, Dec; 16(12):1077-85.

Campos A. (2004). Histología cuerpo y medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina. Madrid.

Caspar-Bauguil S., Cousin B., Galinier A., Segafredo C., Nibbelink M., André M., Casteilla L., Pénicaud L. (2005). Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett.*, 579, 3487-92.

Caplan A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 9: 641-50.

Casteilla L., Planat-Bérnard V., Cousin B., Silvestre J.S., Laharrague P., Charrière G., Carrière A., Pénicaud L. (2005). Plasticity of adipose tissue: A promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.*, 98: 922-26.

Chiu R.C. (2008). Msc immune tolerance in cellular cardiomyoplasty, *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 20: 115-118.

Cho H.H., Park H.T., Kim Y.J., Bae Y.Ch., Suh K.T., Jung J.S. (2005). Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. *J. of Cell. Biochem.* 96, 533-42.

De Bari C., Dell'Accio F., Luyten F.P. (2001). Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.*, 44(1): 85-95.

De Rosa A., De Francesco F., Tirino V., Ferraro G.A., Paino F., Pirozzi G., Desiderio V., D'Andrea F., Papaccio G. (2009). A new method for the cryopreserving ascS: An attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng. Part C Methods*, in press.

De Ugarte D.A., Alfonso Z., Zuk P.A., Elbarbary A., Zhu M., Ashjian P., Benhaim P., Hedrick M.H. and Fraser J.K. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow, *Immunol. Lett.*, 89: 267-270.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-17.

Duggal S., Fronsdal K.B., Szoke K., Shahdadfar A., Melvik J.E., Brinchmann J.E. (2009). Phenotype and gene expression of human mesenchymal stem cells in alginate scaffolds. *Tissue Eng. Part A*, 15: 1763-73.

Evans M.J., Kaufman M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819): 154–56.

Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V., Panasyuk A.F., Keiliss-Borok I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*, 17(4): 331-40.

Fuchs S., Ghanaati S., Orth C., Barbeck M., Kolbe M., Hofmann A., Eblenkamp M., Gomes M., Reis R.L. and Kirkpatrick C.J. (2009). Contribution of outgrowth endothelial cells from human peripheral blood on *in vivo* vascularization of bone tissue engineered constructs based on starch polycaprolactone scaffolds, *Biomaterials*, 30: 526-534.

Garzon I., Sanchez-Quevedo M.C., Moreu G., Gonzalez-Jaranay M., Gonzalez-Andrades M., Montalvo A., Campos A. and Alaminos M. (2009). *In vitro* and *in vivo* cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J. Periodontal Res.*, 44(5): 588-97.

Geijsen N., Horoschak M., Kim K., Gribnau J., Eggan K., Daley G.Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 427(6970): 148-54.

Grodzinski P., Silver M., Molnar L.K. (2006). Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 6(3):307-18.

Guilak F., Lott K.E., Awad H.A., Cao Q., Hicok K.C., Fermor B. and Gimble J.M. (2006). Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells, *J. Cell. Physiol.*, 206: 229-37.

Hattori H., Masuoka K., Sato M., Ishihara M., Asazuma T., Takase B., Kikuchi M., Nemoto K., Ishihara M. (2006). Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 76(B): 230-39.

Holcomb J.D., Gentile R.D. (2005). Aesthetic facial surgery of male patients: Demographics and market trends, *Facial Plast. Surg.*, 21: 223-231.

Housman T.S., Hancox J.G., Mir M.R., Camacho F., Fleischer A.B., Feldman S.R. and Williford P.M. (2008). What specialties perform the most common outpatient cosmetic procedures in the united states?, *Dermatol. Surg.*, 34: 1-7; discussion 8.

Hu Y., Liao L., Wang Q., Ma L., Ma G., Jiang X., Zhao R.C. (2003). Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J. Lab. Clin. Med.*, 141(5): 342-49.

Hutmacher D.W., Goh J.C., Teoh S.H. (2001). An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications, *Ann. Acad. Med. Singapore*, 30: 183-91.

Im G.I., Shin Y.W., Lee K.B. (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 13: 845-53.

Ishaug S.L., Crane G.M., Miller M.J., Yasko A.W., Yaszemski M.J., Mikos AG. (1997). Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 36(1): 17-28.

Jankowski R.J., Deasy B.M., Huard J. (2002). Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.*, 9(10): 642-47.

Knight M.A., Evans G.R. (2004). Tissue engineering: progress and challenges. *Plast Reconstr Surg.*, Aug;114(2): 26-37.

Kwan M.D., Wan D.C., Longaker M.T. (2007). Principles of tissue engineering. Skeletal - tissue engineering. 3rd. Edit. 62, 935-44. p.935.

Lavik E., Langer R. (2004). Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.*, Jul;65(1):1-8.

- Lin C.S., Xin Z.C., Deng C.H., Ning H., Lin G., Lue T.F. (2008). Recent advances in andrology-related stem cell research, *Asian J. Androl.*, 10: 171-175
- Lin Y., Luo E., Chen X., Liu L., Qiao J., Yan Z., Li Z., Tang W., Zheng X., Tian W. (2005). Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 9: 929-39.
- Ma Z., Kotaki M., Inai R., Ramakrishna S. (2005). Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng.*, Jan-Feb; 11(1-2):101-9.
- 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. USA*, 78(2): 7634-38.
- Matsui Y., Toksoz D., Nishikawa S., Nishikawa S., Williams D., Zsebo K., Hogan B.L. (1991). Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, 353(6346): 750-52.
- Matsumoto T., Kano K., Kondo D., Fukuda N., Iribe Y., Tanaka N., Matsubara Y., Sakuma T., Satomi A., Otaki M., Ryu J., Mugishima H. (2008). Mature adipocyte-derived differentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J. Cell. Physiol.*, 215: 210-22.
- Mauney J.R., Nguyen T., Gillen K., Kirker-Head C., Gimble J.M., Kaplan D.L. (2007). Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin tridimensionales scaffolds, *Biomaterials*, 28: 5280-90.
- McIntosh K., Zvonic S., Garret S., Mitchell J.B., Floyd Z.E., Hammill L., Kloster A., Di Halvorsen Y., Ting J.P., Storms R.W., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble J.M. (2006). The immunogenicity of human adipose-derived cells: Temporal changes in vitro. *Stem Cells.*, 24: 1246-53.
- Mehlhorn A.T., Niemeyer P., Kaiser S., Finkenzeller G., Stark G.B., Sudkamp N.P., Schmal H. (2006). Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng.* 12: 2853-62.

- Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G., Shi S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(10): 5807-12.
- Mitchell J.B., McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Floyd Z.E., Kloster A., Di Halvorsen Y., Storms R.W., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble J.M. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.*, 24: 376-85.
- Munirah S., Kim S.H., Ruszymah B.H., Khang G. (2008). The use of fibrin and poly (lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis. *Eur. Cell. Mater.*, 21(15): 41-52.
- Neuner-Jehle M., Denizot J.P., Borbely A.A., Mallet J. (1996). Characterization and sleep deprivation-induced expression modulation of dendrin, a novel dendritic protein in rat brain neurons. *J. Neurosci. Res.*, 46: 138-51.
- Neuss S., Apel C., Buttler P., Denecke B., Dhanasingh A., Ding X., Grafahrend D., Groger A., Hemmrich K., Herr A., Jahnen-Dechent W., Mastitskaya S., Perez-Bouza A., Rosewick S., Salber J., Wöltje M., Zenke M. (2008). Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomater.*, 29: 302-13.
- Noer A., Boquest A.C., Collas P. (2007). Dynamics of adipogenic promoter DNA methylation during clonal culture of human adipose stem cells to senescence. *BMC Cell. Biol.*, 8: 18.
- Nöth U., Osyczka A.M., Tuli R., Hickok N.J., Danielson K.G., Tuan R.S. (2002). Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J. Orthop. Res.*, 20(5): 1060-69.
- O'Driscoll S.W. (1999). Articular cartilage regeneration using periosteum. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, Oct;(367 Suppl): S186-203.
- Oedayrajsingh-Varma M., van Ham S., Knippenberg M, Helder M.N., Klein-Nulend J., Schouten T.E., Ritt M.J., van Milligen F.J. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy.*, 8: 166-77.

Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-47.

Priya S.G., Jungvid H., Kumar A. (2008). Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 14: 105-118.

Qi L., Zhang C., Greenberg A., Hu F.B. (2008). Common variations in perilipin gene, central obesity, and risk of type 2 diabetes in us women. *Obesity (Silver Spring)*, 16: 1061-65.

Raff M. (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 19: 1-22.

Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L., Donovan P.J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359(6395): 550-51.

Saadeh P.B. Khosla R.K., Mehrara B.J., Steinbrech D.S., McCormick S.A., DeVore D.P., Longaker M.T. (2001). Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *J. Craniofac. Surg.*, 12: 573-79.

Sanchez-Quevedo M.C., Alaminos M., Capitan L.M., Moreu G., Garzón I., Crespo P.V., Campos A. (2007). Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol. Histopathol.* 22: 631-40.

Schaffler A. y Buchler C. (2007). Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells- basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.*, 25: 818-27.

Seol Y.J., Lee J.Y., Park Y.J., Lee Y.M., Young-Ku, Rhyu I.C., Lee S.J., Han S.B., Chung C.P. (2004). Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol. Lett.*, 26(13): 1037-41.

Shamblott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(23): 13726-31.

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

Slack J.M.W. Essential developmental biology. 2^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2002.

Smith A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441: 1060.

Solchaga L.A., Gao J., Dennis J.E., Awadallah A., Lundberg M., Caplan A.I., Goldberg V.M. (2002). Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng.*, 8(2): 333-47.

Stevens B., Yang Y., Mohandas A., Stucker B., Nguyen K.T. (2008). A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 85: 573-582.

Suga H., Eto H., Inoue K., Aoi N., Kato H., Araki J., Higashino T., Yoshimura K. (2009). Cellular and molecular features of lipoma tissue: Comparison with normal adipose tissue. *Br. J. Dermatol.*, in press.

Sugawara K., Hata K. (2008). Industrialization of regenerative medicine in Japan. *Clin. Calcium.*, 18:1751-6.

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-47.

Thowfeequ S., Myatt E.J., Tosh D. (2007). Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Dev Dyn.*, 236: 3208–17.

Troyer D.L., Weiss M.L. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26(3): 591-99.

Trubiani O., Orsini G., Zini N., Di Iorio D., Piccirilli M., Piattelli A., Caputi S. (2008). Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: A morphological report. *J. Biomed. Mater. Res.*, Dec 15;87(4): 986-93.

Tsai R.Y., Kittappa R., McKay R.D. (2002). Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev. Cell.*, 2(6):707-12.

Vacanti C.A., Mikos A.G. (1995). Letter from the editors. *Tissue Eng.*, 1: 1-2.

Walgenbach K.J., Voigt M., Riabikhin A.W., Andree C., Schaefer D.J., Galla T.J., Björn G. (2001). Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat. Rec.*, 263: 372-8.

Wei, Y., Sun, X., Wang, W. and Hu, Y. (2007). Adipose-derived stem cells and chondrogenesis, *Cytotherapy*, 9: 712-16.

Weinzierl, K., Hemprich, A. and Frerich, B. (2006). Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, **34**: 466-471.

Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosebaum M., Leibel R.L., Ferrante A.W. Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 112: 1796-1808.

Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A., Chen H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 112: 1821-30.

Xu, Y., Malladi, P., Wagner, D.R. and Longaker, M.T. (2005). Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **7**: 300-305.

Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering: Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.*, 7(6): 679-89.

Yoo G., Lim J.S. (2009). Tissue engineering of injectable soft tissue filler: using adipose stem cells and micronized acellular dermal matrix. *J. Korean Med. Sci.* 24:104-9.

Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Inoue, K., Suga, H., Eto, H., Kato, H., Hirohi, T. and Harii, K. (2008). Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: Efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells, *Dermatol. Surg.*, 34(9): 1178-85.

Zavan B, Michelotto L, Lancerotto L, Della Puppa A, D'Avella D, Abatangelo G, Vindigni V, Cortivo R. (2010). Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues. *Neurol.Res.* Feb; 32(1): 47-54.

Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4279-95.

Zvaifler N.J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C.J., Moss J., Burger J.A., Maini R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.*, 2(6): 477-88.