



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Instituto Universitario de Investigación
en Biopatología y Medicina Regenerativa

Obtención y caracterización de células del estroma del cordón umbilical humano

Virgínea de Araújo Farias

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Virgínea de Araújo Farias
D.L.: GR 1862-2012
ISBN: 978-84-9028-069-0

Obtención y caracterización de células del estroma del cordón umbilical humano

por

Virgínea de Araújo Farias

Tesis doctoral presentada para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Granada

Virgínea de Araújo Farias

Los directores de la Tesis:

José Mariano Ruiz de Almodóvar
Catedrático en Radiología y Medicina Física

José-luis Linares Fernández
Doctor en Bioquímica e Inmunología

Granada, 2012

José Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera, Catedrático de Radiología y Medicina Física y José-luis Linares Fernández

CERTIFICAN QUE,

Virgínea de Araújo Farias, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado la Tesis doctoral titulada “Obtención y caracterización de células del estroma del cordón umbilical humano” en el Instituto Universitario de Investigación en Biopatología y Medicina Regenerativa del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada y que el trabajo reúne la condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente optando al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Granada, a 2012.

José Mariano Ruiz de Almodóvar
Catedrático en Radiología y Medicina Física

José-luis Linares Fernández
Doctor en Bioquímica e Inmunología

*A meus pais
e a meus irmãos
por estar sempre a meu lado*

*No mistério do sem-fim
equilibra-se um planeta.*

*E, no planeta, um jardim,
e, no jardim, um canteiro;
no canteiro uma violeta,
e, sobre ela, o dia inteiro,*

*entre o planeta e o sem-fim,
a asa de uma borboleta*

Canção Mínima

Cecília Meireles [1901-1964]

Agradecimientos

A mis padres, que durante todos estos años me habéis apoyado incondicionalmente y habéis hecho posible el estar aquí dedicada exclusivamente a lo que siempre he querido. Esta tesis es el resultado del esfuerzo conjunto y la realización de un sueño compartido. Mi agradecimiento más profundo y especial hacia vosotros y hacia mis hermanos.

A los directores de la tesis, especialmente a Mariano, que me ha recibido en su laboratorio y ha confiado en mí, proporcionándome las condiciones para realizar la investigación desarrollada en esta tesis doctoral. Gracias por tu apoyo y ayuda constante.

A Jesús por la ayuda impagable durante los momentos más complicados en la realización de los experimentos y de la tesis, por los consejos y por tu amistad.

Al Dr. Alberto Puertas y a su equipo del Hospital Universitario Virgen de las Nieves por su aportación para esta tesis.

A todos los compañeros de laboratorio que he tenido y a los compañeros “adoptivos” de los otros laboratorios del instituto. A Blanca, David y Sandra con quienes he compartido los comienzos en el laboratorio. A Raquel y Ester por su disponibilidad y paciencia para colaborar con los experimentos. A Gustavo y a Mohamed por su infinita paciencia. A Iana y a Jaime por el trabajo duro que también es parte de esta tesis y por todo lo que me han enseñado. Y a todos vosotros por vuestra amabilidad y amistad.

Y a mi Fran por haber estado a mi lado apoyándome siempre y a su familia por la acogida tan cariñosa y por haberse convertido en mi segunda familia ayudándome a atenuar el sufrimiento que supone estar tan alejada por tanto tiempo de los que más quiero.

Índice general

Índice general	xiii
Índice de tablas	xvii
Índice de figuras	xix
1 Introducción	1
1.1 Las células madre: clasificación, cultivo y caracterización	1
1.2 Una aproximación experimental a la solución de la inhibición del crecimiento por contacto	24
1.3 Modelo para el desarrollo inicial de aplicaciones clínicas	29
2 Hipótesis y objetivos	35
2.1 Hipótesis de trabajo	35
2.2 Objetivos concretos	39
3 Material y métodos	41
3.1 Obtención y cultivo de las células madre estromales	41
3.2 Cultivo de células mesenquimales en matrices tridimensionales .	58
3.3 Respuesta de las células estromales y las tumorales a la radioterapia	61

4	Resultados	67
4.1	Crecimiento y fenotipaje de las células estromales de cordón umbilical	67
4.2	Cultivo, crecimiento y diferenciación de células estromales sobre TCA	83
4.3	Radiosensibilidad celular y sensibilidad a los experimentos de transferencia de medio	85
5	Discusión	97
5.1	Las células madre: clasificación, cultivo y caracterización	97
5.2	Modelo para el desarrollo inicial de aplicaciones clínicas	104
6	Conclusiones	119
	Referencias	121
A	Consentimiento informado	141
B	Publicaciones	147
	Tela de Carbón activo: biomateriales para la proliferación y diferenciación de células mesenquimales	149
	The importance of bystander effects in radiation therapy in melanoma skin-cancer cells and umbilical-cord stromal stem cells	151
	Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties	153
	Activated carbon cloth as support for mesenchymal stem cell growth and differentiation to osteocytes	155

C Presentaciones en congresos	157
Abreviaturas	159

Índice de tablas

1.1	Células madre humanas de tejidos fetales y perinatales	13
1.2	Células madre adultas humanas	16
1.3	Requerimientos de expresión mínimos para células MSC	19
1.4	Expresión positiva de antígenos de membrana estudiados en células UCSSC y MSC	22
1.5	Expresión positiva de antígenos de membrana estudiados en células UCSSC y MSC	23
3.1	Relación de anticuerpos utilizados en la determinación del inmunofenotipo de secciones de cordón umbilical y de las células UCSSC . .	51
3.2	Relación de anticuerpos utilizados en la determinación del fenotipo de 5 líneas de células UCSSC en dos condiciones de cultivo.	52
3.3	Parejas de cebadores para los factores de transcripción utilizados en la caracterización molecular de las líneas celulares UCSSC.	53
4.1	Valoración del inmunofenotipo de las células presentes en las secciones de cordón umbilical y de células células madre estromales de cordón umbilical (UCSSC) cultivadas	77
4.2	Valores característicos de las líneas celulares usadas	89

Índice de figuras

1.1	Divisiones asimétricas y simétricas de las células madre	3
1.2	Hipótesis sobre la regulación de las divisiones asimétricas de las células madre	7
3.1	Purificación de células adherentes presentes en el estroma perivascular a los vasos de cordón umbilical	43
4.1	Cinética de crecimiento de células UCSSC a diferentes concentraciones de oxígeno	68
4.2	Eficiencia en la formación de colonias de células UCSSC a diferentes concentraciones de oxígeno	69
4.3	Cinética de crecimiento de UCSSC	70
4.4	Estabilidad del cariotipo de UCSSC	71
4.5	Inmunohistoquímica de secciones transversales de cordón umbilical a bajo aumento.	71
4.6	Identificación <i>in situ</i> de las UCSSC por inmunohistoquímica	72
4.7	Células CD10+ en cortes transversales de cordón umbilical	73
4.8	Corte transversal de la arteria del cordón umbilical antes y después del tratamiento enzimático	74

4.9	Caraterización <i>in situ</i> de células UCSSC por inmunohistoquímica en secciones transversales de cordón umbilical	75
4.10	Caraterización inmunocitoquímica <i>in vitro</i> de células UCSSC cultivadas	76
4.11	Análisis por citometría de flujo de antígenos de membrana positivos en células UCSSC cultivadas a 5 % O ₂ a pases 3-5	78
4.12	Análisis por citometría de flujo de antígenos de membrana negativos en células UCSSC cultivadas a 21 % O ₂ a pases 3-5	79
4.13	Expresión de factores de transcripción relacionados con la pluripotencialidad	80
4.14	Diferenciación <i>in vitro</i> de células UCSSC	81
4.15	Capacidad contráctil de las células UCSSC	83
4.16	Adhesión y proliferación de células UCSSC cultivadas sobre TCAs .	84
4.17	Diferenciación osteogénica de células UCSSC en TCAs	86
4.18	Células UCSSC a los 14 días de inducción a condrocitos	87
4.19	Curvas de la dosis-respuesta clonogénica en células tumorales y troncales directamente irradiadas	88
4.20	Cinética de reparación de las roturas dobles de cadena de ADN tras 6 Gy de dosis en células UCSSC y células de melanoma (A375 y G361)	90
4.21	Estudio del efecto de vecindad mediante experimentos de transferencia de medio.	91
4.22	Células apoptóticas hipodiploides detectadas por citometría de flujo tras el tratamiento de células de melanoma con medio medio condicionado por la irradiación (MC) durante 24 horas	95
5.1	Modelo de daño al ADN y modelo no-diana tras radioterapia	112

5.2 Modelo para la acción biológica de una dosis típica de radiación . . . 115

Introducción

1.1 Las células madre: clasificación, cultivo y caracterización

Los avances alcanzados en la última década en el conocimiento de la biología de las células madre han aumentado el interés de los científicos en las potencialidades de estas células. Su utilización en estudios toxicológicos y en el descubrimiento de nuevos fármacos, además de la utilización en terapia celular, son algunas de las posibles aplicaciones más atractivas de estas células.

Las células madre poseen capacidad de autorrenovación y de compromiso para diferenciarse hacia un determinado linaje celular, tanto durante la embriogénesis como en la etapa de desarrollo hasta alcanzar la morfología de células adultas y que perduran durante toda la vida del organismo manteniendo sus características [1].

Durante la embriogénesis las células madre embrionarias se diferencian pa-

ra dar origen a todos los tejidos del embrión. En el organismo adulto las células madre adultas son las responsables del mantenimiento de la integridad y función de los tejidos a través de la renovación celular [2]. Además, estas células cuentan con la capacidad de dividirse simétricamente para mantener la población de células indiferenciadas del organismo y asimétricamente (Figura 1.1) para generar una célula-hija heredera de las características de la célula madre y otra célula-hija comprometida con la diferenciación a uno o varios tipos celulares funcionales, siendo así, causa del desarrollo y fuente de la renovación y mantenimiento de los tejidos diferenciados del organismo [3-6]. Sobre estas propiedades y capacidades se puede formular la definición de célula madre.

1.1.1 La hipótesis de la troncalidad

De la definición de célula madre surge la hipótesis de troncalidad, según la cual todas las células madre comparten características de plasticidad y capacidad de autorrenovación que están reguladas por la expresión de un conjunto de genes determinado que puede ser entendido como una firma molecular específica.

Probablemente, el empleo de las células madre como alternativa terapéutica que lleve a la curación de diversas enfermedades degenerativas a través de la terapia celular y de la ingeniería tisular sea la aplicación que atrae más interés de la sociedad en general [1]. Pero para que sea posible, es imprescindible el amplio conocimiento de la biología de estas células, en todos los sentidos, ya que la falta de control del crecimiento de las células madre en el organismo humano podría llevar a la formación de teratomas [7].

Las células madre utilizan redes transcripcionales muy complejas para promo-

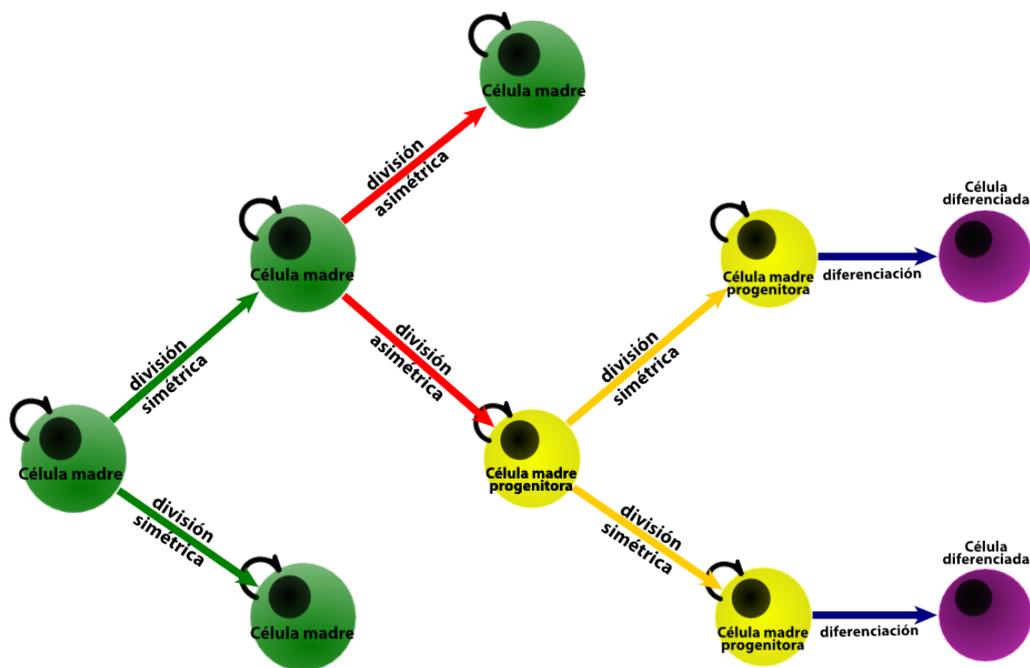


Figura 1.1: Divisiones asimétricas y simétricas de las células madre. División simétrica de las células madre: genera dos células-hijas idénticas con capacidad de autorrenovación. División asimétrica de las células madre: genera una célula-hija idéntica y una célula-hija progenitora con capacidad de autorrenovación y de diferenciarse a células especializadas de un linaje con el cual está comprometida. (Diferenciación: las células progenitoras se diferencian hacia células maduras y especializadas).

ver la autorrenovación y mantener la plasticidad y a pesar del conocimiento que se ha creado en los últimos años sobre el mantenimiento de la troncalidad de las células madre o su compromiso con la diferenciación, el entendimiento de estos mecanismos está, todavía incompleto. Estudios recientes han empezado a descifrar los esquemas de la troncalidad y sugieren que a la complejidad de las redes de regulación génicas de las células madre se suman factores epigenéticos [8].

Se han llevado a cabo muchos estudios comparativos con la intención de determinar el perfil transcripcional en varios modelos tanto de células madre humanas

como de células madre extraídas de animales, entre ellas tenemos las células madre embrionarias (ESC) [9-12], las células madre hematopoyéticas (HSC) [10, 13, 14] y más recientemente, las células madre pluripotenciales inducidas (iPSC). Sin embargo, la definición de un perfil transcripcional común a todas las células madre no ha podido ser determinado con precisión.

Las redes transcripcionales en las células ESC y las interacciones que mantienen la pluripotencialidad se encuentran fuertemente influenciadas por los factores de transcripción codificados por los genes *POU class 5 homeobox 1 (POU5F1)*, *SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2)* y *Nanog homeobox (NANOG)*. Por ello, estos genes han sido considerados los genes reguladores de la troncalidad.

En un estudio reciente Koeva y col. [15], utilizando los datos de varios estudios hechos del perfil transcripcional de células madre murinas, han desarrollado un método que permite la identificación de patrones específicos de expresión en grupos de genes homólogos en células madre. Utilizando este procedimiento se cree que, aunque varíe la expresión de un gen individual entre tipos de células madre distintos, la expresión global del conjunto de módulos debe permanecer a niveles suficientes para el mantenimiento de la troncalidad. De esa manera, se han podido identificar alrededor de 40 genes y 224 módulos sobre-expresados en muchos tipos de células madre y entre ellos se incluyen genes responsables de la conformación de la cromatina, genes que intervienen en la reparación del daño al ADN y genes relacionados con la ruta de señalización de wnt. Esta metodología puede conducir a la identificación de un patrón transcripcional característico de las células madre.

El nicho celular de las células madre

El nicho celular de las células madre es el microambiente en el cual se encuentra una población de células madre. Estudios realizados en modelos de división asimétrica murino y en *Drosophila* aportan evidencias que soportan la idea de que la activación de los genes implicados en el mantenimiento de la troncalidad se debe no sólo a mecanismos moleculares intrínsecos a la célula madre, sino que también es sensible a la transducción de estímulos procedentes del nicho de las células madre [3].

La combinación de estos estímulos provenientes del nicho celular con los mecanismos moleculares intrínsecos a las células madre sería responsable tanto del mantenimiento de la población de células madre (autorrenovación), como de la iniciación de las vías de diferenciación hacia los linajes correspondientes.

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son el modelo de células madre de mamífero mejor estudiado en lo que se refiere a las divisiones asimétricas de las células madre. Las células HSC han demostrado ser capaces de diferenciarse de forma asimétrica y simétrica para generar células-hijas diferentes o idénticas a la célula madre. Las células HSC que se dividen asimétricamente generan células-hijas con niveles desiguales en las moléculas que intervienen en la ruta de señalización notch, y esto se ha considerado un requerimiento para mantener la troncalidad en células HSC. De ese modo, las poblaciones derivadas de la célula-hija con menor actividad de la ruta de señalización notch han resultado estar más comprometidas con la diferenciación, mientras que las poblaciones con altos niveles de la ruta de señalización notch proliferaban más rápidamente manteniendo las características de troncalidad sin iniciar el proceso de diferenciación [16].

Por otro lado, se ha observado que las células HSC cultivadas en presencia de células de una línea osteoblástica, presentan más divisiones asimétricas que cuando son cultivadas en presencia de una línea celular estromal, en cuya situación prevalecen las divisiones simétricas [16]. Todo esto confirma que las divisiones asimétricas en células HSC tienen además de un componente intrínseco, otro extrínseco (Figura 1.2) donde el contacto célula-célula con los otros tipos celulares que constituyen su nicho juega un papel fundamental en el mantenimiento de la troncalidad de las células madre [4].

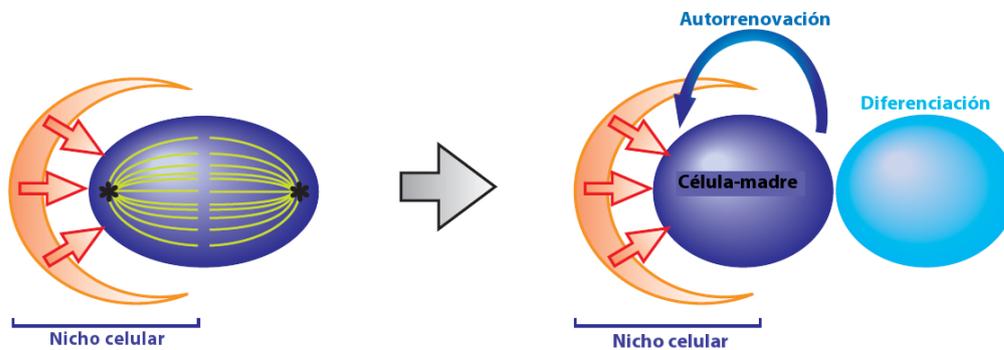
En un estudio reciente Rehman [17] ha relacionado el mantenimiento del estado de indiferenciación y pluripotencialidad de las células madre con los bajos niveles de estructuras mitocondriales y con la utilización preferente de la glicolisis no oxidativa como fuente principal de energía en detrimento de la fosforilación oxidativa. Estos datos surgen de la comparación de células embrionarias humanas y células pluripotenciales inducidas con células madre en proceso de diferenciación. En este sistema experimental se ha comprobado que las células indiferenciadas presentaban menor número de mitocondrias que las células diferenciadas.

La plasticidad de las células madre

La plasticidad de las células madre es la propiedad de mayor trascendencia para la utilización de estas células en medicina regenerativa. Por plasticidad entendemos la capacidad de las células madre para diferenciarse hacia varios tipos celulares distintos. En orden decreciente de plasticidad las células pueden ser totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.

La **totipotencialidad** se define como la capacidad que tiene una célula de di-

A Regulación extrínseca



B Regulación intrínseca

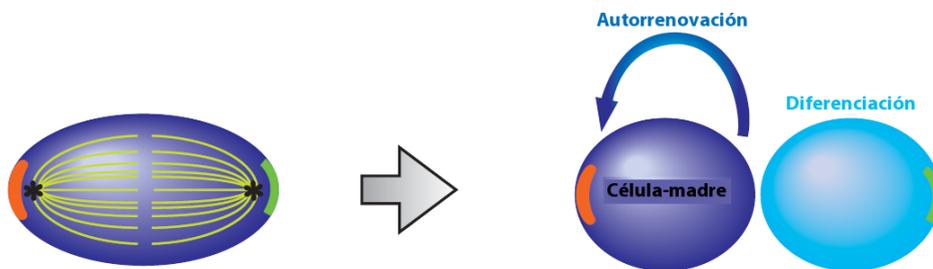


Figura 1.2: Hipótesis sobre la regulación de las divisiones asimétricas de las células madre. (A) La célula madre se divide asimétricamente en respuesta a los estímulos provenientes del nicho celular y genera una célula madre – autorrenovación – y una célula comprometida con la diferenciación. (B) La célula madre segrega de forma asimétrica factores relacionados con el mantenimiento de la troncalidad a una célula-hija, y con el comprometimiento lineal a la otra célula-hija. Adaptado de Y. M. Yamashita y col. “Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis.” En: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.1 (ene. de 2010), a001313. DOI: 10.1101/cshperspect.a001313

ferenciarse hacia todos los tipos celulares de un organismo, con cariotipo normal [18]. Por definición, las células totipotenciales del organismo humano son el cigoto y los blastómeros tempranos de la mórula. En ratones se ha demostrado la totipotencialidad de los blastómeros de los estadios de 4, 8, 16 y 32 células a través de la formación de quimeras normales y fértiles después de haberse inyectado una única célula en el interior de un blastocisto y comprobar que esta célula marcada

contribuye a la formación de todos los tejidos de la quimera [19, 20].

En la actualidad está ampliamente aceptado que durante el desarrollo del embrión existe una pérdida progresiva de la plasticidad de las células que lo constituyen. Inicialmente se pierde la totipotencialidad de los blastómeros tempranos en el proceso de diferenciación hacia trofoblasto y embrioblasto. El trofoblasto originará los tejidos extraembrionarios y el embrioblasto, que mantiene la pluripotencialidad, dará origen a los tejidos embrionarios. Aunque son totipotenciales, los blastómeros tempranos no son considerados células madre porque no se ha podido demostrar que en cultivo posean la capacidad de proliferación extensiva [21, 22].

Según la potencialidad de diferenciación *in vitro* que presentan, los varios tipos de células madre pueden ser clasificados en pluripotenciales, multipotenciales o unipotenciales.

En el año 1981 dos grupos distintos (Evans y col. [23], Martin [24]) consiguieron establecer independiente y simultáneamente por primera vez una línea celular *in vitro* a partir de la masa interior de células o embrioblasto (ICM) de embriones murinos. Las células cultivadas *in vitro* han demostrado mantener su pluripotencialidad inicial. Actualmente estas células se conocen como células madre embrionarias (ESC).

En la búsqueda de otras fuentes de células madre no-embrionarias, se ha observado que en tejidos como la piel, la sangre y el epitelio intestinal, la duración del tiempo de vida de las células diferenciadas es muy corto y estas células no tienen capacidad de autorrenovación. De este hallazgo ha surgido la hipótesis de que los

tejidos adultos tienen una población de células madre que deben ser responsables del mantenimiento de la población celular diferenciada [25].

En la actualidad se han caracterizado células madre en casi todos los tejidos humanos adultos y fetales, con potencialidades de diferenciación, cinéticas de proliferación y características moleculares diferentes según su origen. La capacidad de diferenciación de estas células está comprendida desde la multipotencialidad hasta la unipotencialidad.

Así distinguimos entre las ESC, y sabemos que son capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares del organismo humano y que por ello, las llamamos **pluripotenciales**. Por otro lado, son ejemplos de células madre **multipotenciales** las células madre hematopoyéticas (HSC), comprometidas a diferenciarse hacia células del linaje sanguíneo; las células madre neurales (NSC), comprometidas a diferenciarse hacia células de los tejidos neuronales y las células madre mesenquimales (MSC) capaces de diferenciarse hacia células derivadas de la capa mesodérmica del embrión. Finalmente como ejemplo de células madre **unipotenciales** están las derivadas de la córnea [26], o de los vasos [27].

Mediante estudios genómicos se han intentado identificar el perfil molecular responsable de la pluripotencialidad en células ESC y más recientemente en células iPSC. Y se han identificado algunos genes cuyos niveles de expresión cambian cuando las células inician el proceso de diferenciación. No obstante, aún no se conoce con exactitud el mecanismo molecular por el cual la pluripotencialidad se mantiene en el tiempo, en las células madre [28-30].

1.1.2 Las células madre humanas según su origen

Una sistemática elemental permite distinguir entre células madre embrionarias, fetales, adultas y más recientemente las iPSC. Las ESC son las que se obtienen a partir del embrión. Las células madre fetales se han derivado a partir de tejidos fetales y de tejidos extraembrionarios. Las células madre adultas se obtienen de los tejidos desarrollados del organismo desde el nacimiento hasta la edad adulta. Las células iPSC se obtienen a través de la reprogramación celular.

Células madre embrionarias

A principio de los años 1960 a partir de estudios de maduración de oocitos [31] comenzaron a desarrollarse las técnicas de fertilización *in vitro*, del diagnóstico genético y del cultivo de células madre humanas con vista a la terapia celular de enfermedades degenerativas. Pero fue sólo en el año 1998 cuando Thomson y col. [32] lograron por primera vez aislar células ESC humanas. Las ESC caracterizadas desde entonces se han obtenido a partir de embrioblastos de blastocistos destinados para su utilización en fertilización *in vitro* y donados luego para la experimentación.

Las células ESC son actualmente un modelo de células madre ampliamente estudiado cuyas principales características *in vitro* comprenden la formación de colonias, la estabilidad cariotípica, el mantenimiento de la troncalidad aun después de muchos pasajes y la pluripotencialidad. Morfológicamente se caracterizan por la alta proporción del núcleo en relación al citoplasma; pueden ser criopreservadas y cuando se las descongela mantienen todas sus características iniciales. Además, estas células presentan altos índices de actividad de la telomerasa, lo que sugiere

que su poder replicativo es mayor que el de las células somáticas [32].

En el intento de caracterizar el patrón de expresión de las células ESC se han realizado muchos estudios y se acepta actualmente que *POU5F1* [28, 33-37], *SOX2* [33-38] y *NANOG* [35, 39, 40] son los principales factores de transcripción involucrados en el mantenimiento de las características de las ES humanas y murinas. Además parece que *NANOG* es especialmente importante en el establecimiento de la pluripotencialidad, pero no es necesario para su mantenimiento.

A pesar del gran potencial de diferenciación que caracteriza a las células madre embrionarias, la investigación con células madre se ve obstaculizada en muchos casos por consideraciones éticas que conciernen a la destrucción de embriones humanos, que en teoría, tienen potencial para formar un ser humano. Por otro lado uno de los mayores obstáculos para su utilización en terapias es su potencial replicativo ilimitado, que puede llevar a la formación de teratomas *in vivo*, y el hecho de que deban no ser inmunocompatibles con el receptor [25].

Células madre fetales

Las células madre fetales son una alternativa interesante de células madre para su utilización en la investigación. Se obtienen a partir de tejidos fetales y de las estructuras extraembrionarias, de origen fetal, por lo que su utilización no se ve limitada por casi ninguna barrera ética. Además, la naturaleza inmunológicamente inmadura de estos tejidos hace de las células madres fetales una buena alternativa para su utilización como fuente heteróloga de células madre en terapia celular por su baja inmunogenicidad [41].

En muchos estudios, las células madre fetales, han demostrado gran similitud con las células madre embrionarias en lo que concierne a la expresión de marcadores, la capacidad de autorenovación, el amplio espectro de diferenciación que en muchas ocasiones se extrapola hacia la multipotencialidad (Tabla 1.1) y que se demuestra por su capacidad de diferenciarse hacia células originadas a partir de otras capas germinales.

Las células madre del líquido amniótico expresan los marcadores típicos células madre mesenquimales tales como *Thy-1 cell surface antigen (THY1)*, *5'-nucleotidase, ecto (NT5E)* y endoglina (*ENG*) [60, 62], son negativas para los marcadores de células hematopoyéticas como las moléculas de *CD14*, molécula de *CD34 (CD34)CD34* y *protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC)*, también conocido como *CD45* [60, 63] expresando además marcadores de células madre embrionarias como son el *POU5F1*, *NANOG* y *SSEA-4* [61, 83, 84]. Por otra parte estas células no expresan los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II [60, 61, 63], lo que les confiere baja inmunogenicidad. En la población de células madre del líquido amniótico hay una subpoblación de estas células positivas para *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (KIT)*, que cuando se expanden *in vitro* han demostrado que son capaces de conservar la troncalidad, pero también la extensión de los telómeros, la estabilidad cariotípica hasta más de 250 duplicaciones de población y además, cuando se inyectan en modelos animales, no forman teratomas [60].

Las células madre amnióticas se pueden obtener a partir de las células epiteliales amnióticas (AEC) y a partir de las células mesenquimales amnióticas (AMC). Las células madre obtenidas a partir de las AEC tienen mayor plasticidad que las

Tabla 1.1: Células madre humanas de tejidos fetales y perinatales.

Origen	Plasticidad de las líneas ^a									
	Mesodermo			Endodermo				Ectodermo		
	O	C	A	M	E	P	Hep	N	G	
Amnios	[42-46]	[43-45]	[43-45]	[43, 44, 47-49]	[44]	[43, 49]	[43, 49-52]	[43, 46, 49, 52]		
Corion	[45, 53-55]	[45, 53]	[45, 53-55]	[45, 53, 56]		[57]	[58]	[53, 59]	[59]	
Líquido amniótico	[60-63]	[60, 61, 64]	[60-63]	[60]	[60]		[60]	[60-63]		
Sangre de cordón umbilical	[65, 66]	[65, 66]	[65, 66]		[67]			[67, 68]		
Cordón umbilical	[66, 69-72]	[66, 70]	[66, 69-72]	[66]		[73]				
Vasos del cordón umbilical	[74-76]		[74-76]		[76]					
Articulación fetal	[77]	[77]							[77]	
Bazo fetal	[78]		[78]							
Columna fetal	[79]	[79]	[79]							
Femur fetal	[79]	[79]	[79]							
Médula ósea fetal	[78, 80, 81]	[78, 80, 81]	[78, 80, 81]							
Músculo esquelético fetal	[82]	[82]	[82]	[82]	[82]					
Pulmón fetal	[78]		[78]							
Sangre fetal	[80, 81]	[80, 81]	[80, 81]							

^a Diferenciación hacia **O**: Osteocitos, **C** Condrocitos, **A** Adipocitos, **M** Músculo, **E** Células endoteliales, **Hep** Hepatocitos, **N** Células neuronales, **G** Células de la glía.

células madre obtenidas a partir de las AMC. De hecho, una subpoblación de las primeras, son positivas para los marcadores típicos de las células embrionarias, como el SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81, *POU5F1*, *NANOG* y el *SOX2* [43, 85], lo que podría ser una explicación para justificar esta diferencia en la plasticidad. Las células madre amnióticas se han demostrado capaces de diferenciarse hacia células derivadas de las tres capas germinales del embrión (Tabla 1.1) y *in vivo* no forman teratomas [43].

Las células madre coriónicas se purifican a partir de dos tipos celulares: células mesenquimales estromales coriónicas y células trofoblásticas coriónicas. Tienen en cultivo una cinética de crecimiento muy similar a las células MSC de médula ósea y expresan genes de la pluripotencialidad como *POU5F1*, *NANOG* y otros genes que son expresados en células madre embrionarias como SSEA-4 y *zinc finger protein 42 homolog (mouse) (ZFP42)* [54, 86]. Además, tienen una plasticidad amplia y son capaces de diferenciarse a células de todas las capas germinales (Tabla 1.1).

Células madre adultas

En la década de los 70 Friedenstein y col. [87] aislaron por primera vez células madre de tejidos adultos humanos. Estas células pueden ser obtenidas, posiblemente, de cualquier tejido del organismo humano adulto. Aunque no son pluripotenciales como las ESC, las células madre adultas tienen capacidad de proliferar *in vitro* durante muchas generaciones manteniendo un cariotipo normal. Son capaces de diferenciarse al tipo celular del órgano de donde provienen y conservar un potencial variable de diferenciación a células representativas de otros tejidos en función de las condiciones de cultivo a las que están sometidas [41, 88-90] (Tabla

1.2). Además, en contraposición a lo que se creyó durante muchos años, estudios recientes han aportado evidencias que sugieren que las células madres específicas de ciertos tejidos pueden diferenciarse hacia células de tejidos diferentes a los del órgano de donde provienen [90]. Es decir, los límites de su potencial de diferenciación están aún por ser precisamente definidos en diferentes condiciones experimentales y fisiológicas.

Las células HSC y las MSC son probablemente los tipos de células madre adultas mejor descritas en la actualidad.

Las células madre hematopoyéticas pueden ser purificadas a partir de la médula ósea, de la sangre de cordón umbilical y de la sangre periférica. Son una población de células madre positivas para *CD34* capaces de diferenciarse a las células de linaje mieloide y linfoide.

Las células madre mesenquimales MSC son células madre adultas que están presentes en todos los tejidos de origen mesenquimal del organismo adulto y que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento y la regeneración de muchos tejidos siendo, en situación de quiescencia, la fuente de células con capacidad para diferenciarse hacia los tipos celulares de los tejidos donde residen [103].

Las MSC por definición son capaces de diferenciarse a células originarias de la capa mesodérmica del embrión. Se ha descrito, sin embargo, que células MSC de diferentes tejidos son capaces de diferenciarse hacia tipos celulares no sólo de origen mesenquimal tales como condrocitos, osteocitos, adipocitos y miocitos, sino que en algunos casos se ha demostrado su diferenciación hacia neuronas y hepatocitos. *In vitro* las células MSC exhiben capacidad de proliferación extensiva sin

Tabla 1.2: Células madre adultas humanas aisladas de prácticamente todos los tejidos adultos.

Origen	Plasticidad de las líneas ^a									
	O	C	A	M	H	E	P	Hep	N	G
Dental										
Hueso trabecular	[91]									
Ligamento										
Médula ósea	[92, 93]	[92-96]	[92, 93]					[97, 98]		
Membrana sinovial	[93, 99]	[93, 99]	[93, 99]	[99]						
Músculo	[93]	[93]	[93]							
Paladar									[100]	[100]
Peristio	[93]	[93]	[93]							
Piel				[101]					[101]	[101]
Sangre menstrual	[102]	[102]	[102]	[102]					[102]	
Tejido Adiposo	[42, 92, 93]	[92-94]	[42, 92, 93]							

^a. Diferenciación hacia **O**: Osteocitos, **C** Condrocitos, **A** Adipocitos, **M** Músculo, **H** Células hematopoyéticas, **E** Células endoteliales, **Hep** Hepatocitos, **N** Células neuronales, **G** Células de la glía

desarrollar alteraciones cariotípicas, esta estabilidad cromosómica es una de las premisas necesarias para que un tipo celular sea considerado como célula madre.

Desde la primera línea de células MSC obtenida a partir de la médula ósea [87], varios grupos han podido aislar células MSC a partir de diferentes tejidos del organismo humano adulto [82, 89, 99, 104, 105].

La multipotencialidad de las células MSC se ha podido comprobar en modelos animales, utilizando células MSC de médula de ratón trasplantadas en condiciones apropiadas a un blastocisto; en estas condiciones se ha demostrado la contribución de las células MSC a la formación de los tejidos derivados de las tres capas germinales del embrión [90].

Las células MSC pueden ser aisladas con relativa facilidad por su capacidad de adherirse a la placa de cultivo. Sin embargo, las poblaciones resultantes conservan siempre una cierta heterogeneidad morfológica y variaciones en el potencial de diferenciación (Tabla 1.2), que se advierten inclusive en una misma población celular. Así, algunas células presentan morfología fibroblastoide y otras una forma más pequeña y que se acompaña de una más rápida proliferación [106].

La capacidad de diferenciación *in vivo* de estas células ha sido comprobada en algunas ocasiones en modelos animales de enfermedades humanas y en situaciones de terapia celular en seres humanos. Se ha conseguido, mediante una inyección de células MSC de médula ósea, regenerar una zona infartada en un modelo murino de enfermedad coronaria arterial. En estos experimentos se ha demostrado que las células MSC son capaces de formar nuevo músculo cardíaco y estructuras vasculares [107]. En otro estudio [89], se han trasplantado células MSC obteni-

das de médulas óseas alogénicas en niños con osteogénesis imperfecta. Las células MSC trasplantadas se han diferenciado a osteoblastos, células estromales de médula ósea y fibroblastos, incrementando significativamente el ritmo de crecimiento de los huesos de los pacientes.

La evidencia de diferenciación *in vivo* y la relativa facilidad de aislar células MSC humanas en comparación con otros tipos de células madre, así como la posibilidad de obtener MSC alogénicas abre vías para la aplicación de estas células en la clínica.

La heterogeneidad de las células MSC se evidencia cuando se estudia la expresión de sus antígenos de membrana, cuya variabilidad dificulta la caracterización y el establecimiento de un patrón de expresión molecular de superficie celular común a todos los tipos de células MSC. En los estudios donde se han aislado células MSC se ha intentado obtener un perfil de expresión molecular que fuese lo más representativa posible de este tipo de células. Pero las moléculas analizadas, cuya expresión varía según qué estudios y según qué población celular, han permitido definir los antígenos de superficie que se consideran más característicos para fenotipar estas células. Estos antígenos se resumen en la Tabla 1.3 [108].

Por otra parte se han caracterizado otras células madre troncales obtenidas a partir de tejidos post-natales que poseen capacidades de diferenciación diferentes, a las de las MSC entre ellas están las células madre hematopoyéticas (HSC) y las células madre neurales (NSC). En algunos casos se ha aislado tipos celulares con potencial de diferenciación superior al de las MSC, como es el caso de las células madre progenitoras adultas multipotenciales (MAPC) aisladas a partir de

médula ósea humana [109-111].

Tabla 1.3: Requerimientos de expresión mínimos para células MSC.

Marcador	Expresión en células MSC ^a	Referencia ^b	Símbolo oficial ^c	Nomenclatura oficial ^c
CD73	+	4907	<i>NT5E</i>	<i>5'-nucleotidase, ecto</i>
CD90	+	7070	<i>THY1</i>	<i>Thy-1 cell surface antigen</i>
CD105	+	2022	<i>ENG</i>	endoglina
CD11b	-	3684	<i>ITGAM</i>	integrina, alfa M (<i>complement component 3 receptor 3 subunit</i>)
CD14	-	929	<i>CD14</i>	molécula de CD14
CD19	-	930	<i>CD19</i>	molécula de CD19
CD34	-	947	<i>CD34</i>	molécula de CD34
CD45	-	5788	<i>PTPRC</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
CD79a	-	973	<i>CD79A</i>	<i>5'-nucleotidase, ecto</i>
HLA-DR	-		HLA-DR	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR

^a M. Dominici y col. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." eng. En: *Cytotherapy* 8.4 (2006), págs. 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905 ^b NCBI Gene ID ^c HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)

Las células MAPC han sido aisladas a partir de médula ósea, de músculo o de cerebro en ratón [90, 113], en cerdo [114] y en humanos [109-111]. Aunque son consideradas una subpoblación de células MSC, las MAPC tienen capacidad de proliferación hasta más de 120 doblamientos de población manteniendo altos niveles de telomerasa y exhiben un potencial de diferenciación muy similar al de las células embrionarias. No expresan la mayoría de los antígenos de membrana que expresan las MSC (resumidos en la Tabla 1.3), pero son positivos para *alanyl (membrane) aminopeptidase (ANPEP)* y SSEA-4 en el caso de hMAPC, y SSEA-3 en el caso de mMAPC [111]. Al ser negativas para MHC I y MHC II el rechazo

alogénico, tras ser inyectadas en modelos animales, es menor [115-118].

Aranguren y col. [119] han confirmado la capacidad de las células MAPC murinas y humanas para diferenciarse a otros tipos celulares en función del tejido donde se hospeden. Estas células, en un modelo murino de enfermedad vascular periférica (PVD), han sido capaces de permanecer en el tejido-destino durante más de cinco semanas incrementando la función la perfusión del músculo.

Células madre pluripotenciales inducidas

En el año 2006 Takahashi y col. [120] sometieron a estudio un total de 24 genes de conocida implicación en el mantenimiento de la pluripotencialidad y troncalidad de células madre embrionarias murinas y, mediante la transducción retroviral, lograron con la combinación de sólo cuatro de estos genes (*POU5F1*, *SOX2* y el *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)* (*MYC*), *Kruppel-like factor 4 (gut)* (*KLF4*)), reprogramar por primera vez células somáticas murinas a células aparentemente similares a las embrionarias. Las células reprogramadas expresaban los marcadores característicos de células madre embrionarias, tienen un fenotipo muy similar al de las células embrionarias y se comportan como las células pluripotenciales. En la actualidad estas células se conocen por células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) y son un modelo importante para el estudio de las vías y capacidades de la diferenciación celular de las células madre.

1.1.3 Las células madre del cordón umbilical

El cordón umbilical está formado por dos arterias y una vena que quedan envueltas en tejido conectivo y conjuntamente rodeadas por el epitelio amniótico. El

tejido conectivo del cordón (la gelatina de Wharton) tiene origen en el mesoblasto extraembrionario y posee un aspecto gelatinoso [121]. Está compuesto por polisacáridos de cadena abierta distribuidos en forma de miofibrillas constituidas por colágeno tipo I, III y IV, laminina y sulfato de heparina. El componente celular, se encuentra uniformemente repartido y rodeado por el componente gelatinoso. Según la localización de las células estromales en la gelatina de Wharton, las células presentan diferentes grados de diferenciación que varían desde mesenquimales hasta miofibroblastos. Los tipos celulares más inmaduros y proliferativos se localizan cercanos a la superficie amniótica del cordón; a medida que aumenta la distancia de la célula al epitelio amniótico las células estromales adquieren fenotipo de células contráctiles incluyendo la expresión de desmina y α -actina de músculo liso. Por otro lado, las células que circundan los vasos del cordón son miofibroblastos diferenciados y expresan además de desmina y actina, miosina de músculo liso [122, 123].

Se han obtenido células madre a partir de cordón umbilical y de sus partes, incluyendo la sangre contenida en su interior [124-127], así como de los vasos [72, 74, 76, 128, 129] y de la región perivascular [130]. En las Tablas 1.4 y 1.5 se ha resumido la expresión de algunos de los antígenos de superficie que han sido testados para las células obtenidas de cordón umbilical humano. Las células de cordón expresan marcadores típicos de células MSC como *ENG*, *NT5E* y *THY1* y factores de transcripción como *POU5F1* y *NANOG* típicos de células ESC.

Tabla 1.4: Expresión positiva de antígenos de membrana estudiados en células UCSSC y MSC [131].

Marcadores	MSC ^a	UCSSC ^a	Referencia ^b	Símbolo oficial ^c	Nomenclatura oficial ^c
CD10		+	4311	<i>MME</i>	metalo-endopeptidasa de la membrana, conocida usualmente por CD10
CD13	+	+	290	<i>ANPEP</i>	<i>alanyl (membrane) aminopeptidase</i>
CD14		+	929	<i>CD14</i>	molécula de CD14
CD29	+	+	3688	<i>ITGB1</i>	integrina, beta 1
CD44	+	+	960	<i>CD44</i>	molécula de CD44
CD49b		+	3673	<i>ITGA2</i>	<i>integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)</i>
CD49c		+	3675	<i>ITGA3</i>	<i>integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)</i>
CD49d		+	3676	<i>ITGA4</i>	<i>integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)</i>
CD49e		+	3678	<i>ITGA5</i>	<i>integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>
CD51		+	3685	<i>ITGAV</i>	<i>integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)</i>
CD73	+	+	4907	<i>NT5E</i>	<i>5'-nucleotidase, ecto</i>
CD90	+	+	7070	<i>THY1</i>	<i>Thy-1 cell surface antigen</i>
CD105	+	+	2022	<i>ENG</i>	endoglina
CD146		+	4162	<i>MCAM</i>	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>
CD166		+	214	<i>ALCAM</i>	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
HLA-ABC		+			
Nanog		+	79923	<i>NANOG</i>	<i>Nanog homeobox</i>
Sox-2		+	6657	<i>SOX2</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
CD106	+	-/+	7412	<i>VCAM1</i>	molécula de adhesión celular vascular 1
STRO-1	+	-			

^a Antígenos de membrana con expresión positiva en ambos tipos de células madre.

^b NCBI Gene ID.

^c HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC).

Tabla 1.5: Expresión negativa de antígenos de membrana estudiados en células UCSSC y MSC [131].

Marcadores	MSC ^a	UCSSC ^a	Referencia ^b	Símbolo oficial ^c	Nomenclatura oficial ^c
CD31	-	-	5175	<i>PECAM1</i>	molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales
CD33		-	945	<i>CD33</i>	molécula de CD33
CD34	-	-	947	<i>CD34</i>	molécula de CD34
CD38		-	952	<i>CD38</i>	molécula de CD38
CD45	-	-	5788	<i>PTPRC</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
CD56		-	4684	<i>NCAM1</i>	<i>neural cell adhesion molecule 1</i>
CD123		-	3563	<i>IL3RA</i>	<i>interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)</i>
CD133		-	8842	<i>PROM1</i>	<i>prominin 1</i>
CD235a	-	-	2993	<i>GYPA</i>	glicoforina A (grupo sanguíneo MNS)
HLA-DP		-			
HLA-DQ		-			
HLA-DR		-			
HLA-G		-	3135	<i>HLA-G</i>	complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, G
OCT4		-/+	5460	<i>POU5F1</i>	<i>POU class 5 homeobox 1</i>
CD54		-/+	3383	<i>ICAM1</i>	molécula de adhesión celular 1
CD117	-	-/+	3815	<i>KIT</i>	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
SSEA-4		-			

^a Antígenos de membrana con expresión negativa en las células madre UCSSC con relación a las MSC.

^b NCBI Gene ID.

^c HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC).

Las células recién aisladas suelen tener morfología fibroblastoide que permanece hasta los primeros 15 días en cultivo, aunque en varios trabajos ha sido descrita la observación de una cierta heterogeneidad morfológica en los cultivos. Los signos de senescencia replicativa suelen aparecer cuando transcurren aproximadamente 50-60 doblamientos de población sin ningún signo de anomalías cariotípicas. Se

ha descrito que la actividad de la telomerasa es alta en los pases tempranos y que va disminuyendo gradualmente con los pases subsecuentes [65-67, 69-71, 73, 74, 76, 125, 126, 130, 132-136].

El potencial de diferenciación de las células madre de cordón umbilical ha sido comprobado *in vitro* para las rutas de diferenciación adipogénica [69, 133, 137, 138], condrogénica [125, 133, 137, 138], osteogénica [69, 125, 130, 133, 137, 138], cardiomiogénica [125, 129], miogénica [133], neurogénica [69, 138-140] y endotelial [141] *in vitro*.

1.2 Una aproximación experimental a la solución de la inhibición del crecimiento por contacto

La evidencia científica sugiere que la terapia celular y la medicina regenerativa pueden proporcionar soluciones terapéuticas a situaciones patológicas que carecen de tratamiento en la actualidad o pueden ser aplicadas buscando la mejora de los tratamientos disponibles.

Estos procedimientos terapéuticos incluyen el uso de células embrionarias o de células adultas. De estas últimas las que se han empleado más frecuentemente son las derivadas de la médula ósea, ya sea aplicando el conjunto de células mononucleares, a pesar de que sabemos que la población de células obtenidas de la médula ósea es claramente heterogénea; por lo que cuando se utilizan de esta forma se utiliza un “cóctel celular”; esto se puede corregir parcialmente haciendo una selección de determinadas células con mayor frecuencia relacionada con el enriquecimiento de células positivas para *CD34*, la molécula de *CD33* (*CD33*),

la *prominin 1* (*PROM1*) u otros marcadores específicos, o mediante la expansión de células mesenquimale. Otra fuente con la que se está experimentando recientemente por su fácil acceso, son las células adiposas obtenidas mediante liposucción. Otros autores, incluidos nosotros mismo [142], han centrado su interés científico en la obtención de células madre a partir del estroma del cordón umbilical.

Para el avance de la medicina regenerativa se ha requerido, y es necesaria, una integración multidisciplinaria donde diferentes especialidades, entre ellas biología celular, hematología, inmunología, biología molecular, ingeniería de tejidos, biomateriales e investigación clínica, entre otras, agrupen esfuerzos y conocimientos para buscar objetivos comunes. Solo así se logrará el desarrollo de esta tecnología, tanto en sus aspectos básicos como aplicados.

Uno de los problemas de estas fuentes de células madre es la obtención de un número suficiente de elementos celulares que permitan su utilización en procedimientos clínicos. Un número inadecuado de células podría imposibilitar o retrasar el efecto terapéutico y disminuir la supervivencia del paciente.

Para ser utilizadas en procedimientos clínicos de terapia celular las células MSC aisladas del propio paciente, o de donantes sanos, deben ser expandidas en el laboratorio hasta alcanzar cifras que permitan la dosificación de 1 a 5×10^6 células por kg de peso del paciente y deben ser inyectas intravenosamente, o colocadas mediante intervención en el lugar preciso, en el paciente a tratar [143]. Sin embargo esta expansión está limitada por la superficie de los frascos empleados para su cultivo. Y cuando esta superficie se cubre totalmente las células dejan de crecer. Esto obliga a su despegue del soporte y a su distribución, diluyéndolas, en nuevos

frascos de cultivo. Esto se hace de manera reiterada lo que conduce a una pérdida de la viabilidad celular y de sus potencialidades de diferenciación.

Creemos que la aplicación de estructuras tridimensionales, entre ellas las tela de carbón activado (TCA) como estructura capaz de soportar el crecimiento de células madre puede: 1) ofrecer una mayor superficie de crecimiento 2) Mejorar distribución de nutrientes y factores de crecimiento; 3) permitir la fácil manipulación del sistema de cultivo diseñado, 4) asegurar que el despegue de las células del soporte de adhesión se realiza con facilidad y sin pérdida de las potencialidades de las células, y 5) potenciar los procesos de diferenciación de células madre MSC.

Los procedimientos para el aislamiento de las células MSC incluyen la selección mediante adherencia de las células al plástico de los materiales de cultivo [144, 145]. La insuficiencia de nuestro conocimiento sobre la biología básica de las células MSC se refleja en la diferentes formas en las que estas células se cultivan y en las diferentes denominaciones que, para estas células, se están usando: células mesenquimales, células estromales, células aisladas de médula ósea de adultos con potencial de diferenciación inducible (MIAMI), células madre reciclables (RS-1, RS-2) [103], células mesenquimales humanas fetales [146], o células progenitoras adultas multipotenciales humanas (MAPCs) [90].

Además: 1) aunque las células MSC residen en casi todos los tejidos y órganos del ser humano nacido [103] se desconocen también cuáles son las localizaciones exactas y sus funciones precisas *in vivo* [147]; 2) la utilización de células MSC del ser humano adulto para investigación biomédica plantean pocos problemas de orden ético, moral o legal; 3) el cordón umbilical contiene una abundante,

no-controvertida, y fácilmente obtenible fuente de células MSC [131, 138, 148]; y 5) el trasplante de células mesenquimales derivadas de tejidos de seres adultos, ha demostrado ser un tratamiento con cierta eficacia en problemas de salud tales como el infarto de miocardio, los problemas de rechazo en trasplantes, o los trastornos isquémicos de los miembros inferiores [149-154]. La enorme cantidad de células que se precisan obligan al cuidado extremo del crecimiento celular, y de las condiciones en que éste se produce. Y así sabemos que para evitar que las células se aproximen a la confluencia y, consecuencia de esas interacciones célula-célula reduzcan su velocidad de crecimiento se requieren frecuentes actuaciones de mantenimiento y subcultivo (pases sucesivos). Como para despegar las células, y seguir expandiéndolas y cultivándolas, es necesario el tratamiento del tapiz celular con disoluciones que contienen enzimas proteolíticas que degradan, al menos parcialmente, las proteínas de la superficie celular parece lógico pensar que este sub-cultivo repetido afectará a la pluripotencialidad y a la capacidad de proliferación de las células [155, 156].

Tratando de resolver este problema Majd y col. [156] han descrito un método innovador que mantiene la densidad celular, en el cultivo, relativamente constante y que permite obtener un alto número de células MSC autólogas listas para ser utilizadas en procedimientos de medicina regenerativa. El procedimiento se basa en la utilización de una membrana de caucho-silicona altamente extensible cuyo diámetro se expande progresivamente de manera uniforme mediante un motor que actúa de manera continua durante el tiempo de cultivo. Utilizando este instrumento los autores demuestran que es posible de obtener una población de 8×10^8 células partiendo de 5×10^4 células en sólo nueve semanas de cultivo [156].

En cultivos celulares, las estructuras tridimensionales (scaffolds) suministran el soporte necesario, para que las células se adhieran, proliferen e, incluso, se transdiferencien cuando se les suministran los factores de crecimiento y diferenciación apropiados [157].

Teniendo en cuenta lo anteriormente reseñado, sabiendo que la consecución de un crecimiento celular efectivo requiere la eficaz renovación de oxígeno y nutrientes, considerando que la utilidad de las células MSC en clínica es cada vez más prometedora y que es necesario encontrar fuentes de células mesenquimales que sean seguras y fáciles de cultivar, hemos decidido explorar la posibilidad de coleccionar células MSC partiendo del tejido perivascular (Wharton's jelly) del cordón umbilical humano, para hacerlas crecer masivamente sobre un biorreactor en el que las células MSC podrán crecer sobre TCA, disponiendo de una superficie de cultivo amplísima, al tiempo que se preservará sus funciones, su fenotipo y su carácter de células madre multi o pluripotenciales.

Los carbones activados son materiales biocompatibles [158, 159] y en nuestro trabajo previo hemos demostrado que las células pueden adherirse, crecer y diferenciarse sobre su superficie [160]. La adhesión de las células vivas incluye en primera aproximación un fenómeno de adsorción que tiene lugar entre la superficie del carbón y las macromoléculas biológicamente importantes (entre ellas los antígenos de membrana) que forman parte de la estructura externa de las células. La adsorción puede explicarse mediante la teoría de la química de los coloides y las superficies, que incluye tanto la atracción electrostática como la no-electrostática entre las que se encuentran las interacciones hidrófobas. Estas últimas dependen de la hidrofobicidad de la superficie de las células y del carbón y cuando ambas se

incrementan la atracción debe ser más intensa. Una vez que las células se adhieren a la superficie del carbón activado pueden crecer debido a que las propiedades adsorptivas del carbón hacen que el oxígeno y los nutrientes disueltos en el medio de cultivo se concentren en la superficie del carbón [120].

Las telas de carbón activado (TCA) son un nuevo tipo de carbón poroso constituidas por fibras de carbón activado que se encuentran entrelazadas. Las TCA tienen ventajas sobre los clásicos tipos de carbón en forma granular o en polvo, debido a su estructura porosa y mejor manejabilidad. Así, las TCA poseen una estructura porosa típica con poros que se distribuyen perpendicularmente al eje de la fibra lo que les proporciona una enorme área superficial. Estas características hacen que los procesos de adsorción sean muy rápidos y que se incremente la capacidad de adsorción [161].

Además el crecimiento de las células MSC sobre telas de carbón activado nos permitirá estudiar la biocompatibilidad de este material de manera similar a lo recientemente demostrado para los nanotubos de carbono [162, 163]. También estudiaremos la capacidad de las TCA para soportar los procesos de diferenciación celular [160, 164].

1.3 Modelo para el desarrollo inicial de aplicaciones clínicas

1.3.1 Control tumoral y efectos secundarios de la radioterapia

La radioterapia contribuye al tratamiento oncológico de un amplísimo número de pacientes con cáncer pero, inevitablemente, en el volumen corporal sometido a irradiación junto al tumor se incluye cierta cantidad de tejidos peritumorales sanos. La probabilidad de control tumoral es función de la dosis total administrada. La probabilidad de aparición de lesiones colaterales severas es también dependiente de la dosis total administrada y de la naturaleza y el volumen de los tejidos sanos irradiados. El continuo avance del conocimiento, de la instrumentación, y de las técnicas de dosimetría y planificación en radioterapia, han permitido que la proporción de pacientes con complicaciones severas haya disminuido considerablemente. A pesar de ello la morbilidad asociada a la radioterapia es un efecto colateral impredecible, progresivo e irreversible [165, 166] que ocasiona el deterioro de la calidad de vida de los pacientes afectados y que tiene un costo asistencial importante. Se cree que los efectos secundarios de la radioterapia tienen un componente de predisposición genética determinante [167, 168], pero la identificación de cuáles son los pacientes sobre los que gravita el mayor riesgo de padecer complicaciones severas tras radioterapia es hoy un problema por resolver [169]. Las diferencias en la radiorrespuesta de los tejidos sanos, evaluada en términos de toxicidad, están intrínsecamente relacionadas con el tipo celular implicado y con las características proliferativas del tejido. Que la radiosensibilidad de las células y la respuesta de los tejidos sanos a la radiación sean dependientes de factores genéti-

cos o epigenéticos, que distinguen unos pacientes de otros y que podrían, mediante la investigación biomédica, ser identificados o modulados, es algo por demostrar concluyentemente [170].

En este sentido investigaciones de nuestro grupo nos han llevado a estudiar la inducción y la reparación de lesiones moleculares sobre el ADN [171-173], así como el papel de ciertos genes determinantes del resultado terapéutico [174, 175], y cuantificando la respuesta tisular, tras radioterapia por cáncer de mama [176], hemos desarrollado estrategias de investigación encaminadas a predecir la sensibilidad tisular para buscar, entre las pacientes irradiadas aquellas sobre las que gravita el mayor riesgo de padecer complicaciones inducidas de carácter grave, como efecto secundario del tratamiento antitumoral [167, 168]. Esto, si bien nos ha permitido avanzar en el campo teórico de la radiobiología no nos ha proporcionado resultados lo suficientemente consistentes como para ser utilizados en oncología radioterápica [177]. Hoy aceptamos de una manera general que existe variación tanto en la radiosensibilidad de las células tumorales, como en la de las células de los tejidos sanos, y que estas diferencias están relacionadas con la curabilidad y la tolerancia al tratamiento [178].

Las bases teóricas de la radioterapia actual se apoyan en modelos radiobiológicos en los cuales se supone que el efecto de la radiación sobre las células es el resultado de sucesivos eventos, que se inician con la transferencia de energía desde la radiación al ADN y que, produciendo daños letales y daños potencialmente letales, ocasionan la disminución de las células clonogénicas del tumor. En los tumores, el descenso en la supervivencia celular se puede describir matemáticamente mediante una ecuación lineal cuadrática [179, 180]. Esta ecuación matemática

también puede ser usada para explicar la relación de iso-efecto entre esquemas terapéuticos que usen diferentes valores para la dosis total y para la dosis por fracción [181, 182]. Es evidente que para conseguir el control tumoral se requiere que todas las células clonogénicas presentes en el mismo reciban una dosis letal. Sin embargo, los efectos adversos que se asocian al tratamiento con radiación no pueden ser explicados ni con las bases teóricas que hoy aceptamos, ni con estos modelos matemáticos que empleamos, y una teoría más general se nos antoja necesaria [165].

1.3.2 Efecto de vecindad

En radiobiología entendemos por efecto de vecindad la respuesta de células no-irradiadas cuando quedan expuestas a señales procedentes de células que han sido sometidas a tratamiento con radiación. Desde que se describió el efecto de vecindad [183] el significado biológico, la importancia y la extensión de este fenómeno continúan siendo cuestiones abiertas [184]. Sabemos que la aplicación de radiaciones ionizantes a un determinado volumen blanco (tumor + tejidos peritumorales sanos) desencadena efectos biológicos que exceden a los que derivan de la muerte celular radioinducida. En efecto, la radiación produce el tejido irradiado especies reactivas de oxígeno, de nitrógeno y factores proteicos difusibles, algunos de los cuales han sido identificados como posibles mediadores del efecto de vecindad [185], y parece claro que los mecanismos moleculares del daño inducido, mediante efecto de vecindad, sobre las células situadas en la vecindad de las irradiadas es diferente de los efectos genotóxicos que se describen como producidos directamente por la radiación [186]. Las células receptoras transducen las señales en-

viadas por las células irradiadas y ofrecen unas respuestas coordinadas [187-189]. Desde el punto de vista de la estimación del riesgo que acompaña a los usos generales de la radiación la respuesta se ha interpretado como pre-malignizante [190] y se piensa que el efecto de vecindad puede tener implicaciones en el riesgo de la radiación pudiendo desencadenar efectos carcinogénicos o hereditarios [191]. Por el contrario, desde la óptica del empleo de la radiación con fines terapéuticos se puede interpretar este efecto como un elemento positivo que puede incidir positivamente en los resultados de la radioterapia en los pacientes con cáncer [188, 192]. Sin duda que ambas posiciones deben ser consideradas en la estimación del balance riesgo/beneficio cuando se trata de las aplicaciones médicas de la radiación [193, 194].

Para comprender los mecanismos moleculares que son responsables del efecto la vecindad e identificar los factores que potencialmente actúan de manera clastogénica sobre las células en vecindad de las irradiadas, hemos llevado a cabo una serie de experimentos *in vitro* diseñados para examinar si los efectos directos y los fenómenos de vecindad inducidos por la radiación dependen del tipo celular elegido, de las dosis de radiación administradas y de la presencia/ausencia de oxígeno. Como modelos tumorales hemos utilizado líneas celulares establecidas de cáncer de mama y de melanoma humano y como modelos celulares de tejidos sanos hemos utilizado líneas celulares derivadas del estroma del cordón umbilical obtenidas por nosotros mismos en los laboratorios del IBIMER [142, 160]. Los efectos directos de la radiación se han estudiado a dosis comprendidas entre 0 y 8 Gy siguiendo la metodología descrita por nuestro grupo en trabajos previos [171, 195] y los mecanismos del efecto de vecindad se han investigado utilizando la me-

todoología de transferencia de medio [183] utilizando las mismas dosis y el mismo conjunto de modelos y líneas celulares.

Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis de trabajo

El desarrollo creciente de la ingeniería tisular, así como los diversos procedimientos clínicos de terapia celular están estrechamente ligados a la búsqueda de nuevos biomateriales que faciliten: i) La consecución de líneas celulares capaces de proliferar indefinidamente y diferenciarse a diversos tipos de tejidos; ii) La expansión de esas células hasta alcanzar densidades de $1 - 5 \times 10^6$ células por kg de peso del paciente; y, iii) La regeneración de tejidos dañados.

Además, la utilidad de las células mesenquimales en clínica es cada vez más prometedora, siendo necesario encontrar fuentes de células mesenquimales que sean seguras y fáciles de obtener. Por ello, nos planteamos como hipótesis de trabajo el estudio y caracterización de las células mesenquimales derivadas del tejido perivascular (*Wharton's jelly*) del cordón umbilical humano, su caracterización y la expansión y diferenciación de éstas sobre un material biocompatible como son

las telas de carbón activado. Hay que resaltar el hecho de que las estructuras tridimensionales de estos biomateriales proporcionan el soporte adecuado para que las células se adhieran, proliferen e, incluso, se diferencien cuando se les suministran los factores de crecimiento y diferenciación apropiados.

En bibliografía podemos encontrar diversos estudios que se han centrado en el desarrollo de nuevas estructuras tridimensionales “*scaffolds*” a partir de los compuestos biológicos naturales existentes en el hueso o en la matriz extracelular que, además de proporcionar un soporte de fijación para las células, suministran a éstas un microambiente similar al de los tejidos naturales, al actuar como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento y facilitar la interacción de las moléculas señalizadoras con los receptores de la superficie celular. También se ha descrito que los biomateriales basados en macromoléculas pueden afectar a las capacidades celulares de fijación, migración, proliferación y diferenciación. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevos materiales biocompatibles entre los que se encuentran los nanotubos de carbono y las fibras de carbón activado, ya que estos son materiales biocompatibles sobre los que las células pueden adherirse y proliferar. La adhesión de las células vivas sobre el carbón activado, en una primera aproximación, se puede atribuir a un fenómeno de adsorción que tiene lugar entre la superficie del carbón y las macromoléculas que conforman la estructura de la membrana celular (entre ellas los antígenos de membrana). Este proceso de adsorción queda explicado mediante la teoría de la química de los coloides y las superficies, que incluye tanto la atracción electrostática como la no-electrostática entre las que se encuentran las interacciones hidrófobas. Esta última depende de la hidrofobicidad de la superficie de interacción entre las células y el carbón. Cuanto mayor sea esta

fuerza de atracción mejor será el enlace entre el biomaterial y la célula. Una vez adheridas las células a la superficie del carbón, éste facilita el crecimiento celular debido a sus propiedades adsorptivas que hacen que el oxígeno y los nutrientes disueltos en el medio de cultivo se concentren sobre su superficie favoreciéndose así la disponibilidad de los mismos por las células.

Por todo ello, hemos considerado las telas de carbón activado, TCA, como un material adecuado para el soporte, crecimiento, proliferación y diferenciación de las células mesenquimales derivadas del tejido perivascular del cordón umbilical humano. Las telas de carbón activado TCA son tejidos cuyos hilos entrecruzados alternativa y regularmente están constituidos por fibras de carbón activado. Estos materiales presentan muchas ventajas frente a los carbones activados tradicionales en forma pulverulenta o granular. Así, las fibras de carbón activado presentan un área superficial elevada y su estructura porosa típica está desarrollada perpendicularmente al eje de la fibra. Estas características hacen que posean una alta capacidad y rápida cinética de adsorción, tanto en fase líquida como gaseosa. Por otra parte, las células mesenquimales tienen un tamaño del orden de algunas decenas de micrometros, por tanto quedarán sobre la superficie más externa de la TCA atrapadas entre el entramado de fibras de carbón activado que componen su estructura. Cabe la posibilidad de que algunas de las cadenas de proteínas que forman la membrana celular penetren en mayor o menor extensión en los poros de las fibras, interaccionando con sus paredes para actuar como anclaje de las células mesenquimales. Además, el pH de la disolución usada para el cultivo de estas células (7,4) es muy cercano al del pH_{PCC}, por lo que la superficie de la TCA prácticamente estará desprovista de cargas electrostáticas. En estas condiciones predominan las

interacciones no electrostáticas entre la TCA y las células mesenquimales lo que facilita su adhesión. Por tanto, nos planteamos responder a la pregunta: ¿Son las telas de carbón activado un soporte adecuado para la proliferación de las células mesenquimales?. Y, en caso de ser así, ¿Sería posible inducir la diferenciación de estas células adheridas a las TCA?.

La radioterapia contribuye al tratamiento oncológico de un amplísimo número de pacientes con cáncer y más de 800000 pacientes europeos cada año se benefician de los procedimientos radiológicos. La probabilidad de control tumoral es función de la dosis total administrada. La probabilidad de aparición de lesiones colaterales severas es también dependiente de la dosis total administrada y de la naturaleza y el volumen de los tejidos sanos irradiados. El progreso decisivo en este campo sería proporcionar a cada paciente un tratamiento individualizado mediante el que se busque la máxima probabilidad de control tumoral.

En este trabajo abordaremos el problema de investigación desde una aproximación exclusivamente experimental para estudiar la radiosensibilidad intrínseca de las células tumorales en comparación con la de las células madre de tejidos sanos y valorar los efectos colaterales que la irradiación de células produce entre si mismas y sobre las vecinas con independencia del carácter de célula neoplásica o célula troncal perteneciente a los tejidos peritumorales sanos.

La hipótesis general de la línea de investigación en la que se encuadra este trabajo es la siguiente: Las células madre mesenquimales existentes en los tejidos del adulto pueden ser cultivadas *in vitro* y transplantadas a los pacientes que vayan a ser tratados con radiación para disminuir las manifestaciones de la irradiación

aguda y controlar la gravedad de los efectos tóxicos secundarios a la terapéutica con radiación.

2.2 Objetivos concretos

1. Aislar, cultivar y caracterizar células MSC a partir del estroma del cordón umbilical humano.
2. Determinar los parámetros (constante de crecimiento, tiempo de duplicación y número de duplicaciones) que caracterizan la proliferación de las células “stem” multi- o pluripotenciales cultivadas sobre plástico como soporte convencional.
3. Examinar la influencia de las características superficiales de otras estructuras capaces de proporcionar el anclaje de las células para permitir su crecimiento.
4. Comprobar las potencialidades de diferenciación de las células MSC ensayadas en estos tipos de soporte.
5. Valorar los parámetros de radiosensibilidad de las líneas celulares de células mesenquimales obtenidas comparándolos con los encontrados en líneas celulares tumorales humanas.

Material y métodos

3.1 Obtención y cultivo de las células madre estromales

3.1.1 Recogida y transporte de muestras de cordón umbilical humano

Las células del estroma del cordón umbilical humano utilizadas en este estudio fueron obtenidas a partir de muestras tomadas de cordón umbilical de recién nacidos normales que fueron recogidas en el paritorio del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Para conseguir la muestra se informó a la madre del neonato de los objetivos del proyecto de investigación que estamos desarrollando y se obtuvo la correspondiente autorización (véase el documento de consentimiento informado, Anexo A).

Las muestras de cordón umbilical fueron transportadas al laboratorio sumergidas en una solución estéril y fría (temperatura 0 °C) constituida por tampón fosfato

salino (PBS) enriquecido con 20 mM de EDTA (Sigma), 2,5 µg/ml de anfotericina B (Gibco), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco) y 1 % v/v de Penicilina-Streptomicina (Gibco) de acuerdo con las normas establecidas por el Banco de Tejidos y Tumores del Hospital Virgen de las Nieves.

3.1.2 Purificación de las células del estroma perivascular de cordón umbilical

El tiempo máximo transcurrido entre el parto y el procesamiento de las muestras en el laboratorio no excedió nunca las 4 horas. La Figura 3.1 ilustra las fases del proceso de purificación de estas células.

La vena y las arterias que forman parte de la estructura del cordón umbilical fueron separadas del resto del estroma utilizando unas pinzas. Los vasos y el tejido perivascular asociado fueron utilizados para preparar una suspensión de las células por digestión enzimática. El cóctel enzimático estaba compuesto por PBS enriquecido con 1,38 mg/ml de diaspasa (Worthington, 2104), 0,2 mg/ml de hialuronidasa (Sigma, H6254) y 0,8 mg/ml de colagenasa tipo 4 (Worthington, 4188) y se efectuaron dos incubaciones de 45 minutos a 37 °C recogiendo en cada una de ellas el sobrenadante. Posteriormente los restos de tejidos no digeridos fueron incubados 20 minutos a 37 °C con una solución de tripsina al 0,25% m/v (Gibco, 25200075) (tripsina).

Una vez obtenidos, los sobrenadantes de todas las digestiones se mezclaron y se filtraron a través de un filtro de 70 µm para separar los pequeños trozos de tejido no digerido de las células en suspensión.

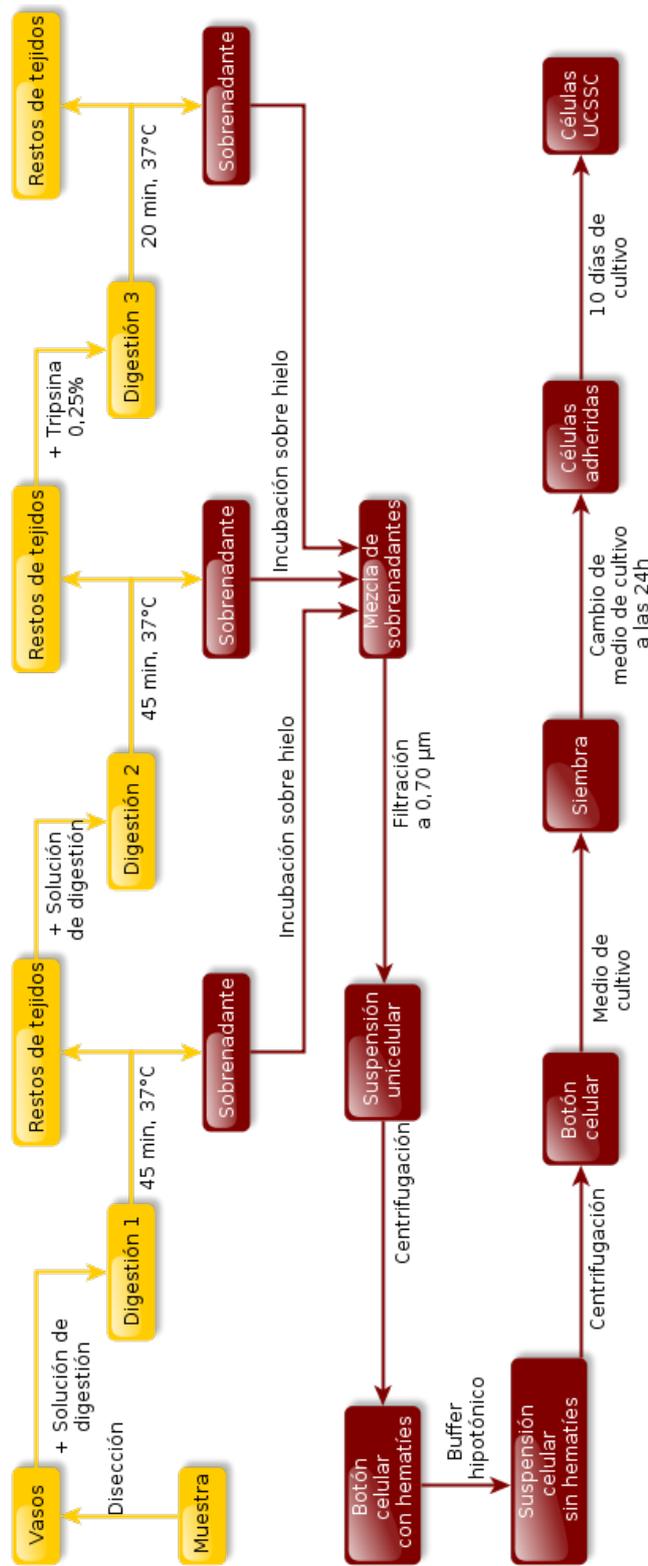


Figura 3.1: Purificación de células adherentes presentes en el estroma perivascular a los vasos de cordón umbilical.

La suspensión resultante contiene células mononucleadas y hematíes. Tras centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, el botón celular se resuspende en 50 ml de tampón hipotónico compuesto de 15,5 mM NH_4Cl , 1 mM KHCO_2 y 10 μM EDTA para lisar las células hemáticas. La suspensión resultante, tras un lavado en medio de cultivo para eliminar restos del tampón de lisis, se resuspendió en medio de cultivo fresco y se distribuyó en placas de cultivo de plástico con la superficie tratada con 5 ng/ml de Fibronectina (Sigma) con objeto de facilitar la adherencia de las células. A continuación, se introdujeron en la estufa de cultivo a 37 °C, 5 % O_2 , 5 % CO_2 y 90 % N_2 (condiciones de hipoxia) durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se cambió el medio de cultivo y se continuaron incubando las células con cambios de medio adicionales cada 3 – 4 días hasta que las células alcancen a cubrir el 70 % – 80 % de la superficie disponible.

3.1.3 Condiciones de cultivo

A las células adherentes así obtenidas las hemos denotado como células madre estromales de cordón umbilical, UCSSC (*umbilical cord stromal stem cells*). Con objeto de determinar si se preservan sus características morfológicas, fenotípicas y su plasticidad, hemos ensayado dos condiciones de cultivo distintas: 1) hipoxia, a 37 °C con 5 % de CO_2 , 5 % de O_2 y 90 % de N_2 y 2) la normoxia, a 37 °C con 5 % de CO_2 , 21 % de O_2 y 74 % de N_2 .

El medio de cultivo estándar empleado posee los siguientes componentes: 60 % v/v DMEM con 1 g/l de glucosa (Gibco, 11885092), 40 % v/v MCDB-201 (Sigma, M-6770), 2 % v/v suero bovino fetal (FBS), 0,8 mg/ml BSA (Sigma, A-1933), 1× LA-BSA (Sigma, L-9530), 1× ITS (Sigma I-3146), 1× Penicilina-Streptomina

(HyClone, SH30010), $1,0 \times 10^{-4}$ mM ácido ascórbico (Sigma, A-8960), $5,0 \times 10^{-9}$ M dexametasona (Sigma, D-2915), 10 ng/ml de EGF (Sigma, E-9644), 10 ng/ml de PDGF (Peprotech, 100-14B) y $5,0 \times 10^{-5}$ M de β -mercaptoetanol (Gibco, 31350-010), complementado con el 1 % v/v de concentrado de lípidos (Gibco, 11905). Este medio se cambió cada 3 ó 4 días en función de las necesidades del cultivo.

En algunos ensayos se utilizó otro medio de cultivo, medio de cultivo 2, con mayor contenido en suero fetal (medio de cultivo al 10 % FBS) compuesto de un 89 % de DMEM con 1 g/l de glucosa (Gibco, 11885092), 10 % de FBS (PAA, 1087), 1 % de penicilina-streptomina y 5×10^{-7} M de β -mercaptoetanol (Gibco).

Una vez que las células han alcanzado el 70 % – 80 % de confluencia se despegan con tripsina y se subcultivan sembrando una fracción de $1,5 \times 10^5$ células en cajas de cultivo de 75 cm². El excedente de células se criopreservó a -175 °C en medio de cultivo enriquecido con 10 % v/v dimetilsulfóxido (Sigma, D2650) (DMSO), 10 % v/v FBS (PAA, 1087).

3.1.4 Estudios de cinética del crecimiento de las poblaciones

celulares

Con el objetivo de determinar los parámetros del crecimiento de la población celular hemos hecho estudios de la cinética del crecimiento de las poblaciones celulares en condiciones estándar (normoxia) y en hipoxia (sección 3.1.3).

Se sabe que las poblaciones celulares en cultivo incrementan su número en una manera dependiente del tiempo de cultivo. El proceso de división celular concluye

al final de cada ciclo celular con la duplicación de la célula. Así, en una población celular sincrónica en la que todas las células alcanzan la mitosis exactamente al mismo tiempo, el incremento del número de células en la población se expresa de la forma siguiente:

$$N_t = 2^x \quad (3.1)$$

Siendo N_t el número de células en la población para el tiempo t y x el número de divisiones que la población ha llevado a cabo en este tiempo.

En el caso de ser la población celular asíncrona y de que contenga células en situación no-proliferativa, el número de células por unidad de tiempo no se puede determinar por la ecuación 3.1 ya que sólo una fracción k de las células iniciales pasa por mitosis por unidad de tiempo; la ecuación que refleja este incremento es del tipo:

$$N_t = N_0 e^{kt} \quad (3.2)$$

Donde N_0 es el número de células sembradas en el tiempo inicial, N_t es el número de células para el tiempo t y k es la constante de velocidad de crecimiento celular.

Las células tardan cierto tiempo en completar el ciclo celular. En este tiempo la célula duplica tanto su material estructural como el genético y se divide dando origen a dos células idénticas, si la división es simétrica al final de la mitosis. El valor de ese tiempo se define como tiempo de ciclo (T_c) y su valor no es igual para todas las células de un organismo, ni para una población específica que crece formando un tapiz celular en una placa de cultivo. Además, en todos los tejidos hay células en estado quiescente, G_0 , que no forman parte del compartimiento proliferativo. De ser así, para describir la cinética del crecimiento de una población celular se utiliza, el tiempo de duplicación (T_D) definido como el intervalo de tiempo necesario

para que el grupo celular duplique sus elementos y que se expresa de la siguiente forma:

$$T_D = \frac{\ln 2}{k} \quad (3.3)$$

Otro parámetro habitualmente utilizado para expresar la cinética de proliferación celular es el número acumulado de duplicaciones de población (DP) que se define como el número de veces que una población ha doblado su número inicial de células (N_0). Esto se expresa mediante la expresión matemática que sigue:

$$DP = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad (3.4)$$

El T_D y el DP han sido los parámetros que hemos usado para caracterizar la cinética de las líneas celulares derivadas de los cordones umbilicales recogidos en este estudio.

Los datos necesarios para estudiar la cinética de las líneas celulares establecidas, han sido obtenidos mediante el recuento, en cámara de Neubauer, del número de células al inicio y al final de cada pase (70 % a 80 % de confluencia, N y $N_{0[x]}$) y hemos cuantificado también el número de células a sembrar en el siguiente pase ($N_{0[x+1]}$). Estos recuentos se han repetido en cada pase. Además, se anotó el tiempo de cultivo necesario para que en cada pase se alcanzase el estado de subconfluencia (70 % – 80 %). Así, se disponía de los datos necesarios: número de células y tiempo de cultivo.

3.1.5 Capacidad de formación de colonias en condiciones estándar y en normoxia

Con objeto de validar la capacidad de las células UCSSC para formar colonias a lo largo del período de su cultivo se sembraron por triplicado 500 células por placa de Petri de 10 cm de diámetro, a pases distintos y se incubaron en condiciones estándar y hipóxica. Los cambios de medio de cultivo se efectuaron cada 3 o 4 días y el cultivo se mantuvo hasta los 14 días, al término de los cuales las placas se fijaron con etanol al 70 % v/v, durante 5 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron con cristal violeta durante 10 minutos. Finalmente, tras lavar las placas y dejarlas secar, se hizo el recuento de colonias, considerando como colonias aquellas que contenían más de 50 células.

3.1.6 Cariotipo al final de la fase exponencial de la proliferación celular

El crecimiento de las células UCSSC parece ajustarse a un modelo exponencial al menos hasta que las células alcanzan tiempos de cultivo de alrededor de $DP \approx 40$. En distintos intervalos de ese periodo de cultivo hemos tomado muestras de las células y las hemos cariotipado para verificar que durante todo el tiempo de cultivo han mantenido la estabilidad cromosómica.

El estudio del cariotipo se ha realizado tratando las células durante 2 horas con 50 mg/ml de colchicina (Logical Industries) para inhibir la mitosis y mantener las células en metafase. Tras esto, se despegan las células con una solución de 2,5 mg/ml de tripsina y 0,4 mg/ml de EDTA (Gibco, 25200-072) incubando

el botón celular durante 20 minutos a 37 °C con una solución acuosa de KCl al $7,5 \times 10^{-1}$ M previamente calentado a esa misma temperatura. De esta manera se lisan las células y se liberan los núcleos. En lavados sucesivos en una solución fría de metanol al $2,46 \times 10^{-2}$ M y ácido acético al $1,75 \times 10^{-2}$ M los núcleos se fijan y se eliminan las membranas celulares. Finalmente, los núcleos fijados se depositan en láminas previamente limpias y se dejan secar. Para hacer el bandeamiento G de los cromosomas se incuban las láminas con los núcleos fijados a 47 °C durante 24 horas y se tratan con una solución de 2 mg/ml de tripsina a temperatura ambiente durante unos segundos para después lavar con PBS y dejar secar. Posteriormente las láminas se tiñen con una solución 1:1:8 de Giemsa:H₂O:PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se lavan en agua corriente y se dejan secar.

Para determinar el número modal de cromosomas por núcleo se analizaron por observación microscópica un total de 23 metafases.

3.1.7 Estudios del fenotipo de las células UCSSC in situ y in vitro

Para identificar el lugar de donde provienen las células separadas mediante el tratamiento enzimático del estroma del cordón umbilical se comparó las células así obtenidas con las existentes en muestras de cordones umbilicales intactos y en los vasos, antes y después llevar a cabo el tratamiento enzimático descrito en la sección 3.1.2.

Todas las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10 % durante 24 horas e incluidas en parafina para luego seccionarlas y tratarlas con distintos anticuerpos para marcar los antígenos. Las secciones de 4 µm de espesor fueron

cortadas a lo largo del eje horizontal de las piezas y entonces desparafinadas, hidratadas y tratadas a 98 °C durante 20 minutos en una solución tampón de 1 mM de EDTA a pH 8,0 en un módulo PT (Thermo Fisher, Fremont, CA) para dejar accesibles los epítomos antigénicos correspondientes a las células.

Para comparar el fenotipo de las células encontradas en las secciones de cordón umbilical con las células purificadas y cultivadas, estas últimas fueron cultivadas sobre portas estériles durante 24 horas y luego fijadas durante 5 minutos en PFA al 4 % para después teñirlas.

Los anticuerpos utilizados en la determinación de la expresión inmunofenotípica de los distintos marcadores han sido recogidas en la Tabla 3.1. Para los controles se utilizó el isotipo IgG1/ κ y suero normal de conejo. Los anticuerpos fueron incubados con las muestras a temperatura ambiente. El estudio inmunohistoquímico se hizo en un *immunostainer* automático (Autostainer 480, Thermo Fisher) usando un procedimiento basado en la técnica de la polímero-peroxidasa, seguido del desarrollo con diaminobenceno, para conseguir un precipitado marrón, o del desarrollo con aminoetilcarbazol, para conseguir un precipitado rojo (Master Diagnóstica).

Ademas, se ha estudiado el fenotipo de las células cultivadas por citometría de flujo, usando un citómetro FACSCanto II (BD), con objeto de comparar el patrón de expresión de las células obtenidas en este trabajo, con el patrón típico de las células madre mesenquimales descrito por otros grupo. La relación de anticuerpos seleccionados se muestra en la Tabla 3.1.

En todos los casos, para separar las células, las placas de cultivo fueron tra-

Tabla 3.1: Relación de anticuerpos^a utilizados en la determinación del inmunofenotipo de secciones de cordón umbilical y de las células UCSSC.

Marcador	Clon	Dilución
Vimentina ^b	V9	1/200
CD45 ^b	Mezcla	1/60
CD68 ^b	Kp1	1/30
CD31 ^b	JC/70A	1/25
CD34 ^b	QBEND/10	1/50
Queratina ^b	AE1/AE3	1/500
CD10 ^b	56C6	1/50
Caldesmon ^b	TD107	1/50
Desmina ^b	D33	1/20
alfa actina de músculo liso (<i>ACTA2</i>) ^b	1A4	1/200
gama actina de músculo liso (<i>ACTG2</i>) ^b	HHF35	1/40
Podoplanina ^b	D2-40	1/40
Ki67 ^c	PS6	1/100
Colágeno II ^b	2B1.5	1/20

^a Anticuerpos comercializados por Master Diagnóstica, Granada.

^b Anticuerpo monoclonal IgG1/ κ de rata.

^c Anticuerpo monoclonal IgG1/ κ de conejo.

tadas con una solución de 2,5 mg/ml de tripsina y 0,4 mg/ml de EDTA (Gibco, 25200-072), cuando estuvieron a 70 % – 80 % de confluencia. Tras lavar las células y resuspenderlas en PBS frío se procedió a realizar las tinciones correspondientes con los anticuerpos relacionados en la Tabla 3.2 siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada determinación mediante citometría de flujo se utilizaron 10^5 células.

Un total de 5 líneas de UCSSC cultivadas en condiciones estándar o en nor-

Tabla 3.2: Relación de anticuerpos utilizados en la determinación del fenotipo de 5 líneas de células UCSSC en dos condiciones de cultivo.

Marcador	Anticuerpo
CD10-FITC	Caltag, clone MEM-78
CD14-FITC	BD, clone M5E2
CD29-FITC	Caltag, clone MEM-101A
CD31-APC	R&D, clone9G11
CD34-FITC	BD, clone 2D1
CD44-APC	BD, clone G44-26
CD45-APC	Caltag, clone HI30
CD54-FITC	Caltag, clone MEM 111
CD73-PE	BD Pharmingen, clone AD2-PE
CD90-PE	eBioscience, clone eBio5E10
CD105	Serotec, clone SN6
SMA-Cy3	Sigma, clone IA4

moxia fueron ensayadas y los análisis se han hecho con el programa informático Cell Quest Pro (BD).

3.1.8 Caracterización molecular

Hemos estudiado por PCR la expresión en células UCSSC de factores de transcripción que se identifican de manera habitual en células ES y para los cuales se ha descrito alguna relación con el mantenimiento de la pluripotencialidad, entre ellos hemos valorado la expresión de *POU5F1*, *NANOG*, *KLF4*, *MYC*, *SOX2* y *SALL4*. Las parejas de cebadores específicos para los genes en estudio fueron diseñadas con el programa informático *Primer 3* [196] y figuran en la Tabla 3.3. Cada pare-

ja de cebadores se diseñó, siempre que ha sido posible, de modo que estuvieran separados por al menos un intrón.

Tabla 3.3: Parejas de cebadores para los factores de transcripción utilizados en la caracterización molecular de las líneas celulares UCSSC.

Marcadores ^a	Secuencias de Oligonucleótidos	T ^b	Amplificación ^c
POU5F1-FW	CGAAAGAGAAAGCGAACCAG	60,12	157
POU5F1-REV	GCCGGTTACAGAACCACACT	60,04	
NANOG-FW	ATACCTCAGCCTCCAGCAGA	59,97	174
NANOG-REV	CTGGGGTAGGTAGGTGCTGA	60,13	
KLF4-FW	GTTCCCATCTCAAGGCACAC	60,52	196
KLF4-REV	ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC	60,00	
MYC-FW	CCTACCCTCTCAACGACAGC	59,87	246
MYC-REV	CTCTGACCTTTTGCCAGGAG	59,98	
SOX2-FW	ACACCAATCCCATCCACACT	60,10	224
SOX2-REV	GCAAACCTCCTGCAAAGCTC	60,14	
SALL4-FW	CAGGGATGACCCCTTGTGA	59,78	207
SALL4-REV	CCCCGTGTGTCATGTAGTGA	60,44	
GAPDH-FW	ATGTTTCGTCATGGGTGTGAA	59,81	173
GAPDH-REV	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	60,12	

^a FW: sentido, REV: antisentido

^b Temperatura de hibridación de cada oligonucleótido en °C

^c Tamaño del amplicón en pares de bases (bp)

El RNA de las células UCSSC se preparó a partir de cultivos a diferentes pases homogeneizando el tapiz celular en Trizol (Invitrogen) y procediendo la extracción del RNA de acuerdo con las indicaciones del fabricante (extracción con guanidina fenol-cloroformo basada en el método descrito originalmente por Chomczynski y col. [197]).

Una muestra del RNA extraído, (2 µg), fue sometida a transcripción reversa usando el kit M-MLV (Invitrogen, 28025-013), siguiendo las indicaciones del fa-

bricante. Para cada reacción de PCR se ha utilizado 1 µl del cDNA diluído en los 25 µl totales de la reacción y se ha usado 1 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen 10342-053) y $5,0 \times 10^{-5}$ µM de primers. Las reacciones de PCR se han llevado a cabo utilizando el siguiente protocolo: un ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 57 °C y 30 s a 72 °C y finalizando con un ciclo de 7 minutos a 72 °C.

3.1.9 Diferenciación osteogénica

El estudio de las potencialidades de diferenciación de las células obtenidas se ha realizado mediante la diferenciación osteogénica de células UCSSC tal y como ha sido descrito por Coppi y col. [60]. Para ello, se prepararon placas de cultivo con densidades celulares de $3,0 \times 10^3$ células UCSSC por cm^2 , manteniendo las durante 4 semanas en medio de inducción osteogénica compuesto por DMEM (1 g/l de glucosa) enriquecido con 10 % v/v de FBS (PAA, 1087), 1 % v/v de Penicilina-streptomicina (HyClone SH30010) y con los suplementos osteogénicos ($1,0 \times 10^{-7}$ M de dexametasona (Sigma, D-2915), $1,0 \times 10^{-2}$ M de beta-glicerofosfato (Fluka, 50020), $5,0 \times 10^{-5}$ M de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, A-8960)). El cambio de medio se realizó cada 3 ó 4 días y al final del período de crecimiento e inducción, las placas fueron fijadas con una solución tamponada con 40 mg/ml de PFA y se tiñeron con 10 mg/ml de nitrato de plata y 50 mg/ml de tiosulfato de sodio. El nitrato de plata reacciona con el calcio al ser expuesto a la luz ultravioleta formando un precipitado oscuro, que indica que las células se han diferenciado a osteocitos.

3.1.10 Diferenciación adipogénica

La inducción adipogénica de las UCSSC, se llevo a cabo sembrando $3,0 \times 10^3$ células por cm^2 y, durante 4 semanas, se cultivaron con medio de inducción adipogénica compuesto por: DMEM (1 g/l de glucosa) enriquecido con 10 % v/v de FBS (PAA, 1087), 1 % v/v de Penicilina-streptomicina (HyClone SH30010) y con los suplementos adipogénicos ($1,0 \times 10^{-6}$ M de dexametasona (Sigma, D-2915), $1,0 \times 10^{-3}$ M de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina (Sigma) y $6,0 \times 10^{-5}$ M de indometacina (Sigma). Los cambios del medio de cultivo se realizaron cada 3 o 4 días. Al final del período de crecimiento e inducción las placas fueron fijadas con una solución tamponada con 40 mg/ml de PFA y teñidas con una solución de 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rojo sudán 5B (*oil red O*) en isopropanol. El rojo sudán 5B tiñe las vacuolas de grasa que se forman en las células diferenciadas.

3.1.11 Diferenciación condrogénica

En un tubo de 15 ml se sembraron en forma de botón celular $2,0 \times 10^5$ células UCSSC y se cultivaron en medio de cultivo enriquecido con $1,0 \times 10^{-7}$ M de dexametasona (Sigma, D-2915), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, A-8960) y TGF-beta-3 (Peprotech) en ausencia de suero durante 3 semanas. Los cambios de medio de cultivo se realizaron cada 3 o 4 días.

Al término del periodo de inducción los botones celulares se fijaron con una solución tamponada con 40 mg/ml de PFA. El aspecto externo de los productos de la diferenciación era de apariencia brillante y los pellet fueron procesados para su observación microscópica. Para ello, secciones desparafinadas e hidratadas fueron teñidas con una solución de 20 mg/ml de azul alcian 8 GX (Sigma) a pH 2,5 durante

30 minutos, lavadas en agua y procesadas para observación microscópica.

3.1.12 Ensayos de contractibilidad celular

Los ensayos de contracción de las células UCSSC incluidas en una matriz de colágeno se han realizado según el procedimiento descrito por Muñoz-Fernández y col. [198]. Inicialmente se preparó una mezcla de estéril compuesta de 0,3 mg/ml de colágeno bovino tipo I (BD Bioscience, 354231) frío, $1,0 \times 10^{-3}$ M de NaOH en PBS concentrado (10 ×), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las células UCSSC a pase 3 fueron incorporadas a la dilución de colágeno en PBS a una concentración de $1,0 \times 10^6$ células por ml de solución.

Sobre placas de cultivo de 6 pozos se depositaron 50 µl de la mezcla de células y colágeno y se incubaron a 37 °C durante 2 horas para que se polimerizara la matriz. Inmediatamente después de la gelificación se añaden 2 ml de medio de cultivo al 10 % FBS (descrito en la sección 3.1.3) y las células embutidas se cultivan durante 24 horas en condiciones estándar.

Las respuesta contráctil de las células se estudió tras estimulación con medio de cultivo al 10 % FBS enriquecido con factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (*TGFβ1*) o interleucina 10 (*IL10*) a concentraciones de 10, 25 o 50 ng/ml durante 48 horas. En algunos casos, tras las 48 horas de incubación con la máxima concentración de citoquina, se retiró el estímulo incubando las células con medio de cultivo sin citoquinas para ensayar la reversibilidad del proceso de contracción o relajación inducida por la presencia de las citoquinas. Los controles fueron tratados con medio de cultivo sin citoquinas. Cada condición fue ensayada por triplicado.

Al final de los tratamientos, se realizaron mediciones de la altura (h_n) y del radio (r_n) de cada gota de colágeno utilizando el micrómetro del microscopio. El volumen de las gotas V_n , se calculó utilizando la ecuación del volumen del casquete esférico:

$$V_n = \frac{\pi h_n}{6}(3r_n^2 + h_n^2) \quad (3.5)$$

Los valores calculados para los volúmenes (V_n) en cada condición experimental fueron normalizados usando la siguiente fórmula:

$$V_{n\%} = 100 \times \frac{V_{n0} - V_n}{V_{n0}} \quad (3.6)$$

donde $V_{n\%}$ es el porcentaje de contracción de cada muestra y V_{n0} es el volumen encontrado para los controles del respectivo tratamiento.

Las diferencias entre las medias de los valores encontrados para los tratamientos y sus controles fueron analizadas mediante análisis de varianza.

3.1.13 Microscopía electrónica

El estudio de la ultraestructura de las células UCSSC se realizó mediante microscopía electrónica. Para ello, las células, fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5 % v/v durante 24 horas y luego en tetraóxido de ósmio a 4 °C durante 2 horas. A continuación, se deshidrataron utilizando concentraciones crecientes de acetona y se incluyeron en Epon. Las piezas obtenidas se cortaron con un ultramicrotomo (Reichert-Jung ULTRACUT, Leica Microsystems, Barcelona, Spain) en secciones ultrafinas de 70 μm y se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo. Las secciones se observaron al microscopio electrónico (Zeiss EM 902) y las imágenes

fueron procesadas en el programa informático cell^B para Windows (Soft Imaging System, Münster, Germany).

3.2 Cultivo de células mesenquimales en matrices tridimensionales

3.2.1 Telas de carbón activado (TCA)

Las telas de carbón activado se han empleado como soporte para el cultivo tridimensional de las células UCSSC. Para ello, se han recortado en círculos de dos dimensiones: 6,0 mm o 15,0 mm de diámetro.

Las TCA utilizadas han sido proporcionadas por Kynol Europa. Tienen $2128 \text{ m}^2\text{g}^{-1} \pm 14 \text{ m}^2/\text{g}$ de área de superficie BET, 0,2 % de polvo, 1,7 % de oxígeno y pH_{PZC} 8,0. El pH del medio de cultivo utilizado pH 7,4 junto con las características de las TCA permiten que las células se fijen en dicha matriz, además de facilitar el intercambio de nutrientes entre el medio y la célula.

3.2.2 Cultivo de células UCSSC sobre matriz de TCA

Las células UCSSC cultivadas como se ha descrito anteriormente (sección 3.1.3) se han depositado sobre fragmentos circulares de TCA ubicadas en los pozos de una placa de cultivo de 96 pozos o en una placa de 24 pozos, sembrando $1,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$ células por pozo en medio de cultivo estándar. Los cultivos se siguieron durante 28 días tomando, periódicamente, imágenes y datos de la cinética de su crecimiento.

3.2.3 Transducción de las células UCSSC

El cultivo sobre TCA presenta el inconveniente de que la matriz es opaca y, por ello, para poder observar las células en proliferación por microscopía óptica las células fueron transducidas con un vector lentiviral que contenía el gen de la proteína verde fluorescente GFP.

Las células transfectadas se obtuvieron sembrando $3,0 \times 10^4$ células UCSSC por cm^2 , en placas de cultivo de 6 pozos, adicionando medio de cultivo estándar en condiciones de normoxia durante 24 horas, con objeto de que las células se adhirieran y empezaran a crecer. Al término de este período se cambió el medio de cultivo y se añadieron 0,8 ml de sobrenadante vírico con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sulfato de protamina (Sigma) por pozo e incubándose después en condiciones de normoxia durante 48 horas. Las células, así, transducidas fueron subcultivadas en normoxia y con medio de cultivo estándar hasta alcanzar el 70 % a 80 % de confluencia. La expresión de proteína verde fluorescente (GFP) se cuantificó mediante citometría de flujo.

3.2.4 Proliferación de células UCSSC sobre TCA

El estudio de la cinética de crecimiento de las UCSSC sobre TCA se realizó incubando las telas durante 24 horas en medio de cultivo estándar a 37 °C. A continuación, tras este período de acondicionamiento se sembraron $1,0 \times 10^4$ células transducidas con GFP sobre cada uno de los pozos con TCA y las células se mantuvieron en cultivo en condiciones de normoxia. A las 48 horas de la siembra se trasladaron las TCAs a una placa de cultivo nueva y se cuantificó la cantidad de células que se habían adherido al plástico. A continuación, se paró el cultivo a los 7,

11, 18 y 28 días procediendo a cuantificar el ADN de las células adheridas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado cuantificando el ADN por espectrofotometría.

Como control hemos sembrado la misma cantidad de células en una placa de 96 pozos o en placas de 6 pozos y hemos tomado muestras (por triplicado) a los días 7, 11, 18 y 28 del cultivo. De estas muestras se ha extraído el DNA de las células adheridas y se ha medido su cantidad por espectrofotometría.

Con las medidas tomadas hemos comparado las curvas de crecimiento obtenidas para las células que crecieron sobre TCAs o sobre plástico.

3.2.5 Diferenciación osteogénica

El estudio de la diferenciación osteogénica se ha llevado a cabo induciendo la diferenciación de células UCSSC no marcadas con GFP cultivadas sobre círculos de TCA $1,0 \times 10^4$ células por TCA en una placa de cultivo Petri (10 cm de diámetro). Las células se dejaron crecer durante 4–6 semanas en el medio de inducción osteogénica descrito anteriormente (Sección 3.1.9). El medio se cambió cada 3 a 4 días. Al final del período de inducción hacia la diferenciación osteogénica unas telas fueron destinadas a estudios de microscopía, difracción de rayos-X, espectroscopía de absorción atómica.

3.2.6 Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica de células UCSSC no marcadas con GFP se realizó sembrando $1,0 \times 10^5$ células sobre círculos de TCA en una placa de cultivo

Petri (10 cm de diámetro) durante 4 semanas en el medio de inducción condrogénica descrito anteriormente (Sección 3.1.11). Durante todo el tiempo del cultivo se hicieron sucesivos cambios de medio reemplazando la mitad del medio de cultivo existente en el disco por el mismo volumen de medio fresco con una periodicidad de cada 3 a 4 días. Al final del período de inducción las telas destinaron a estudios de microscopía.

3.3 Respuesta de las células estromales y las tumorales a la radioterapia

3.3.1 Estudios de radiosensibilidad de células UCSSC

En los estudios de radiosensibilidad y efecto de vecindad hemos utilizado, además de células UCSSC, líneas celulares de melanoma humano A375 y G361. Las células A375 nos fueron proporcionadas por el Dr. Bosserhoff (Institute of Pathology, Regensburg University, Germany) y se cultivaron en DMEM-LG (Invitrogen, 21885-108) enriquecido con FBS al 10 %, aminoácidos no-esenciales al 1 % (Invitrogen, 11140035) y con Penicilina-estreptomicina al 1 % (Invitrogen, 15140-122).

Las células G361 (CIC, ECCAC:88033040) fueron obtenidas del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada y fueron cultivadas en DMEM-HG (Invitrogen, 31966-047) enriquecido con FBS al 10 %, y con Penicilina-estreptomicina al 1 % (Invitrogen, 15140-122).

Ambas líneas se sembraron a una densidad de $1,2 \times 10^4$ células por cm^2 y fueron subcultivadas hasta alcanzar el 70 % a 80 % de confluencia.

3.3.2 Producción de medio condicionado: Irradiación a dosis agudas de células UCSSC y de las líneas tumorales

Para estudiar el potencial de sensibilidad por vecindad de las líneas celulares, que hemos incluido en este trabajo se sembraron células a una densidad de $1,3 \times 10^5$ por cm^2 en cajas de cultivo de 75 cm^2 en 10 ml del medio de cultivo. A las 24 horas de la siembra las cajas de cultivo fueron irradiadas, a temperatura ambiente, a una tasa de dosis de 2 Gy/min (usando un irradiador de ^{137}Cs), a dosis totales comprendidas entre 0–8 Gy. Finalizada la irradiación, las células fueron devueltas al incubador, donde tras 24 horas se recogió el medio de cultivo, que se centrifugó a 3 000 rpm a temperatura ambiente y se filtró a través de $0,22 \mu\text{m}$ (Milipore). Este medio, denominado medio condicionado por la irradiación (MC), se usó en los experimentos de transferencia de medio.

3.3.3 Ensayos de transferencia de medio

Los potenciales efectos de vecindad se han estudiado a través de ensayos de transferencia de medio usando medio MC [183]. En todos los casos, células no irradiadas estuvieron en contacto con una fracción determinada de medio MC.

3.3.4 Ensayo de formación de colonias

Para llevar a cabo el experimento de formación de colonias se sembraron 20 células por cm^2 en cajas de 25 cm^2 las cuales fueron tratadas durante 24 horas con medio MC. Al cabo de este tiempo el medio de cultivo fue sustituido por medio estándar. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 10 a 14 días y las colonias resultantes se tiñeron con violeta de genciana y se contó la fracción de células

supervivientes. De este conteo se calcula la fracción de células supervivientes utilizando las expresiones que siguen:

$$E_c = \frac{N^\circ \text{Colonias}}{N^\circ \text{Células}} \quad (3.7)$$

donde E_c es la eficiencia de clonaje de las células control

$$E_T = \frac{N^\circ \text{Colonias}_T}{N^\circ \text{Células}} \quad (3.8)$$

donde E_T es la eficiencia de clonaje de las células tratadas

$$F_s = \frac{E_T}{E_c} \quad (3.9)$$

donde F_s es la fracción de supervivencia

$$F_M = 1 - F_s \quad (3.10)$$

donde F_M es la fracción de muerte.

3.3.5 Análisis de la apoptosis

Tras tratar las células A375 y G361 no irradiadas con medio MC durante 24 horas, se despegaron las células, se lavaron con PBS y se fijaron con etanol frío al 70 % (V/V). Tras esto las células fueron tratadas con una solución tamponada de fosfato y ácido cítrico a pH 7.8 durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se han teñido con una solución compuesta de 100 µg/ml RNAsa y 1 µg/ml de ioduro de propidio durante 30 minutos a 37 °C. El análisis cuantitativo de la distribución de las células en el ciclo celular se realizó utilizando un citómetro FACSCanto II usando el programa informático FACS DIVA (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Esto nos permitió calcular el porcentaje de células existente en fase Sub G1.

3.3.6 Electroforesis de célula única

Hemos cuantificado el daño en el DNA y su reparación a través de una electroforesis de célula única (ensayo cometa) en células de melanoma y en células UCSSC.

El ensayo cometa se realizó tomando células irradiadas a 6 Gy a diferentes tiempos suspendiéndolas en una solución apropiada. Alícuotas de esas soluciones conteniendo 10^3 células fueron embebidas en 120 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (V/V) en PBS a 37 °C. Esta suspensión celular fue depositada sobre un porta-objetos de cristal, protegidas con un cubre e incubadas en el refrigerador durante 5 minutos . El cubre se separó y los portas fueron procesados como ha sido descrito Garcia y col. [199].

La suspensión de células en agarosa, tras haber sido sometida a electroforesis, fue examinada mediante microscopía para localizar las células y cuantificar los parámetros derivados del ensayo cometa. Utilizando el programa informático CASP [200].

3.3.7 Fraccionamiento en el efecto de vecindad

Para investigar la contribución del efecto de vecindad durante el curso de un tratamiento hemos hecho dos ensayos: (i) inicialmente hemos medido la capacidad del medio MC para inducir la muerte celular en células no irradiadas utilizando diluciones sucesivas de medio MC en medio estándar de crecimiento (0/5 a 5/5), (ii) estudio del efecto global del tratamiento con medio MC de forma reiterada sobre la misma población tumoral. En este último caso, se ha empleado un

régimen de fraccionamiento de exposiciones al medio MC en días sucesivos, cambiando em medio MC a las 24 horas durante 4 días. Durante cada uno de esos días un grupo de cajas de cultivo fue separado para continuar con el experimento de formación de colonias. El objetivo del este ensayo fue simular el efecto de vecindad potencialmente producido por cada una de las fracciones de la dosis de radiación administrada al tumor.

CAPÍTULO 4

Resultados

4.1 Crecimiento y fenotipaje de las células estromales de cordón umbilical

4.1.1 Cinética del crecimiento y clonalidad de las células UCSSC cultivadas en dos condiciones

Las células UCSSC extraídas de distintas muestras de cordón umbilical fueron cultivadas en diferentes condiciones de presión de oxígeno para determinar la influencia de la concentración de éste en el ritmo de crecimiento de las células así como, su capacidad de formación de colonias, la duración de los cultivos en fase exponencial y el número de duplicaciones celulares que podían conseguirse al término del experimento.

Hemos podido observar que en condiciones de hipoxia (5 % O₂ y 5 % CO₂) las células UCSSC muestran un enlentecimiento en su crecimiento a los 72 días de

cultivo con $DP_{5\%} = 52$ (Figuras 4.1). En contraste, en condiciones de normoxia (21 % O_2 y 5 % CO_2) las células UCSSC enlentecen su crecimiento, aproximadamente, 10 días antes y el promedio de duplicaciones que son capaces de realizar se sitúa en los $DP_{20\%} = 34$. Además, en la Figura 4.1 se aprecia que en condiciones hipóxicas las células crecen más rápidamente en comparación con las células mantenidas en normoxia. Esta diferencia se pone de manifiesto en el valor de las pendientes de ambas rectas. Así, en condiciones hipóxicas la pendiente de la recta de crecimiento (número de duplicaciones por días de cultivo) es de $0,69 \pm 0,02$ mientras que el valor obtenido para las células en normoxia es de $0,47 \pm 0,03$. A partir del valor de la pendiente de crecimiento se puede determinar el tiempo de duplicación celular. Los datos obtenidos muestran que las células UCSSC duplican su población cada 35 horas en condiciones de hipoxia (5 % de presión de O_2) mientras que en condiciones de normoxia (21 % de presión parcial de O_2) duplican su población a cada 51 horas.

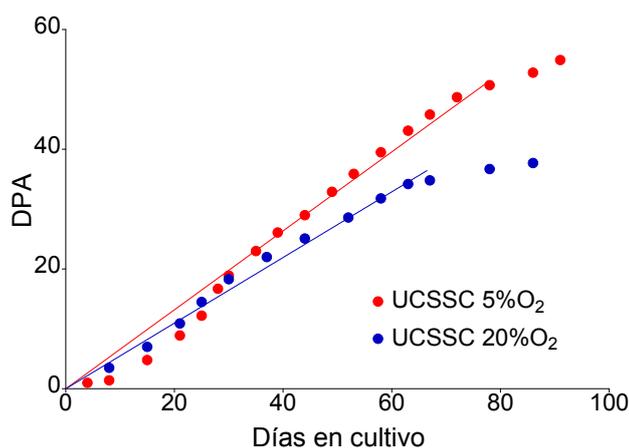


Figura 4.1: Cinética de crecimiento de células UCSSC a diferentes concentraciones de oxígeno. Cada punto en el gráfico representa el valor medio de las duplicaciones de población (DP).

Por otra parte, la eficiencia en la formación de colonias, Figura 4.2, para las células en condiciones de hipoxia se mantuvo en aproximadamente a un 15 % desde el día 17 de cultivo hasta el día 58 de cultivo. Sin embargo, para las células cultivadas en normoxia este coeficiente resultó del orden del 5 % durante los primeros 30 días de cultivo y, además, a partir del día 37 de cultivo la formación de colonias de más de 50 células dejó de ser clara.

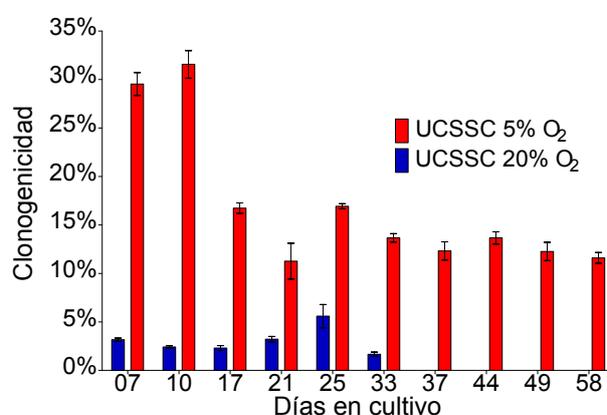


Figura 4.2: Eficiencia en la formación de colonias en células UCSSC cultivadas a 5 % de oxígeno y a 20 % de oxígeno. En cada barra están representados el valor medio de la eficiencia de la formación de colonias (E) y el error estándar $E \pm SEM$.

4.1.2 Cinética de crecimiento de las células UCSSC y estabilidad en el cariotipo en condiciones de cultivo estándar

La cinética de crecimiento celular se siguió a intervalos regulares de tiempo, 3–4 días de subcultivo, y mediante conteo de las células en cámara de “Neubauer”, realizando el seguimiento de 12 muestras de cordones umbilicales diferentes. Del análisis de los resultados obtenidos se desprende que el crecimiento exponencial se mantiene hasta los 80 días de cultivo y que el número de duplicaciones que es

posible alcanzar se sitúa en torno a las 50. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 4.3 ajustándose a una línea recta.

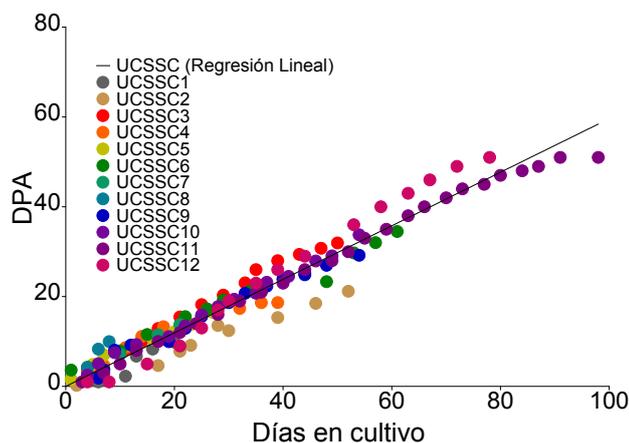


Figura 4.3: Cinética de crecimiento de UCSSC (n=12). Cada punto del gráfico representa el valor medio de DP .

Alrededor de $DP \approx 45$ hemos analizado el cariotipo de las células mantenidas en cultivo. En la Figura 4.4 se muestran los resultados obtenidos, observándose un cariotipo normal de una línea de UCSSC sin alteraciones cariotípicas evidentes, tras un número acumulados de duplicaciones de 45.

4.1.3 Inmunofenotipo de las células UCSSC *in situ* e *in vitro*

Al objeto de establecer EL inmunofenotipo de las células UCSSC *in situ* e *in vitro* se ha estudiado la expresión de un conjunto de marcadores (Tabla 3.1) en secciones transversales de muestras de cordón umbilical y en células UCSSC, cultivadas. Además, mediante inmunohistoquímica se ha identificado las células UCSSC *in situ* y, por citometría de flujo las células UCSSC cultivadas, utilizando los marcadores más característicos de las células madre mesenquimales (Tabla 3.2).

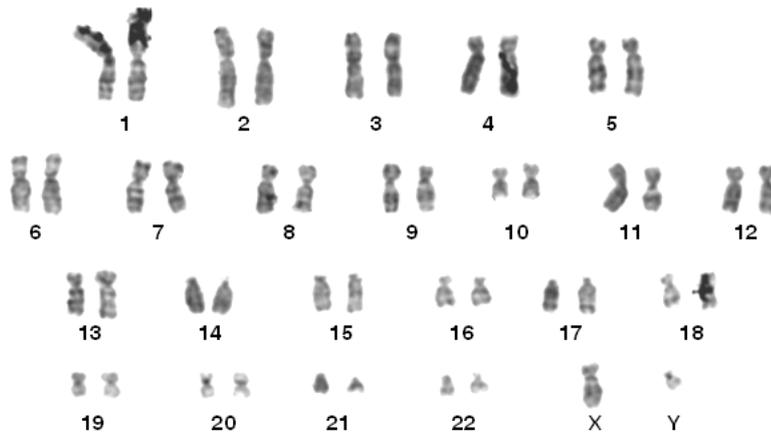


Figura 4.4: Estabilidad del cariotipo de UCSSC (n=23) tras 45 *DP*.

En la Figura 4.5, a bajo aumento, se puede apreciar la expresión de queratinas, SMA y caldesmon, visibles en la zona del músculo liso arterial, donde la densidad celular es alta. También se evidencia la expresión de CD34 en el endotelio de las arterias del cordón umbilical Figura 4.5D.

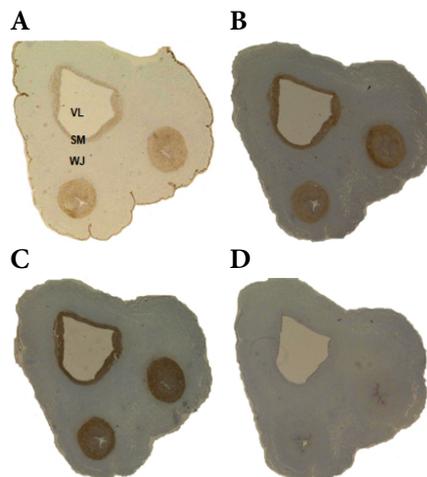


Figura 4.5: Inmunohistoquímica de secciones transversales de cordón umbilical a bajo aumento. Positividad para A, queratinas; la B, SMA y el C, caldesmon en el músculo liso arterial y D, CD34 en el endotelio arterial. VL: luz del vaso; SM: células de músculo liso; WJ: gelatina de Wharton.

En la Figura 4.6 se muestran las secciones de un corte transversal de un cordón umbilical, apreciándose la distribución de las zonas positivas para las queratinas de los clones AE1 y AE3 en vista panorámica Figura 4.6A, y en detalle y a un mayor aumento de $400\times$ en la Figura 4.6D-B. Los anticuerpos anti-queratinas marcan el citoplasma de las células del músculo liso arterial (Figura 4.6D), de las UCSSC presentes en la gelatina de Wharton (Figura 4.6C) y de las células amnióticas epiteliales (Figura 4.6B).

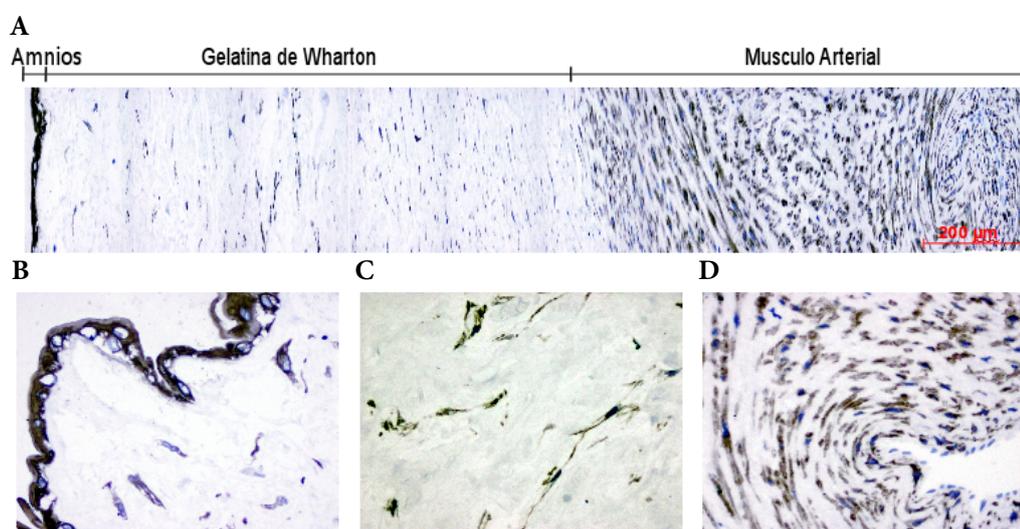


Figura 4.6: Identificación *in situ* de las UCSSC por inmunohistoquímica. Cortes transversales de cordón umbilical teñidos con anticuerpos anti-queratinas (Clones AE1/AE3). A Vista panorámica; B, Amnios; C, Gelatina de Wharton; D, Músculo arterial. Aumento de $400\times$ en B, C, D.

Además, en las secciones teñidas con anticuerpo anti-CD10, Figura 4.7, se puede apreciar con detalle la tinción de la membrana celular de las UCSSC presentes en la gelatina de Wharton (Figura 4.7C). Sin embargo, no se ha podido apreciar tinción en el amnios ni en las células de músculo liso arterial, Figura 4.7B y D.

Para asegurarnos de que tras el proceso de purificación de células UCSSC (ver

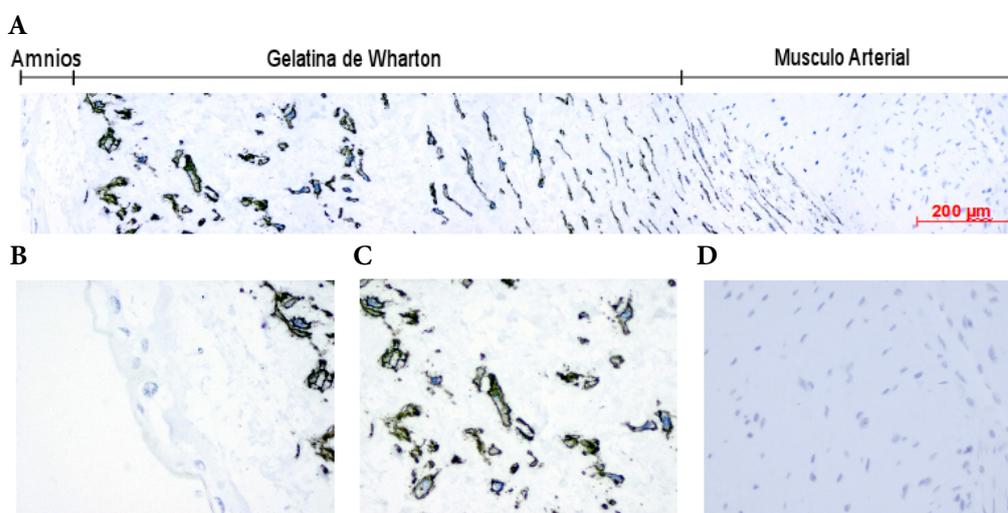


Figura 4.7: Células CD10+ en cortes transversales de cordón umbilical. A, Vista panorámica; B, Amnios; C, Gelatina de Wharton; D, Músculo arterial. Aumento de 400x en B, C, D.

sección 3.1.2) no nos llevábamos células endoteliales ni musculares hemos hecho un estudio de cortes de cordón umbilical antes y después del tratamiento enzimático y hemos podido comprobar que la mayoría de la células CD10+ resultan liberadas con el tratamiento enzimático mientras que las células de músculo liso del vaso CD10- permanecen prácticamente intactas (Figura 4.8).

Las células UCSSC *in situ* son positivas para vimentina, queratina (AE1/AE3), actinas, h-caldesmon y desmina (Figuras 4.9H, A, B, G, C y F respectivamente). Sin embargo, sólo las células UCSSC *in situ* han mostrado ser 100 % positivas para CD10, Figura 4.9E. Además, no se ha podido detectar positividad para CD68, Figura 4.9I, en ningún compartimento del estroma del cordón umbilical y sólo las células endoteliales se han mostrado positivas para CD34, Figura 4.9D.

Las células UCSSC cultivadas tienen un inmunofenotipo muy similar al de las células UCSSC *in situ*, excepto por la bajada en el nivel de expresión de actinas

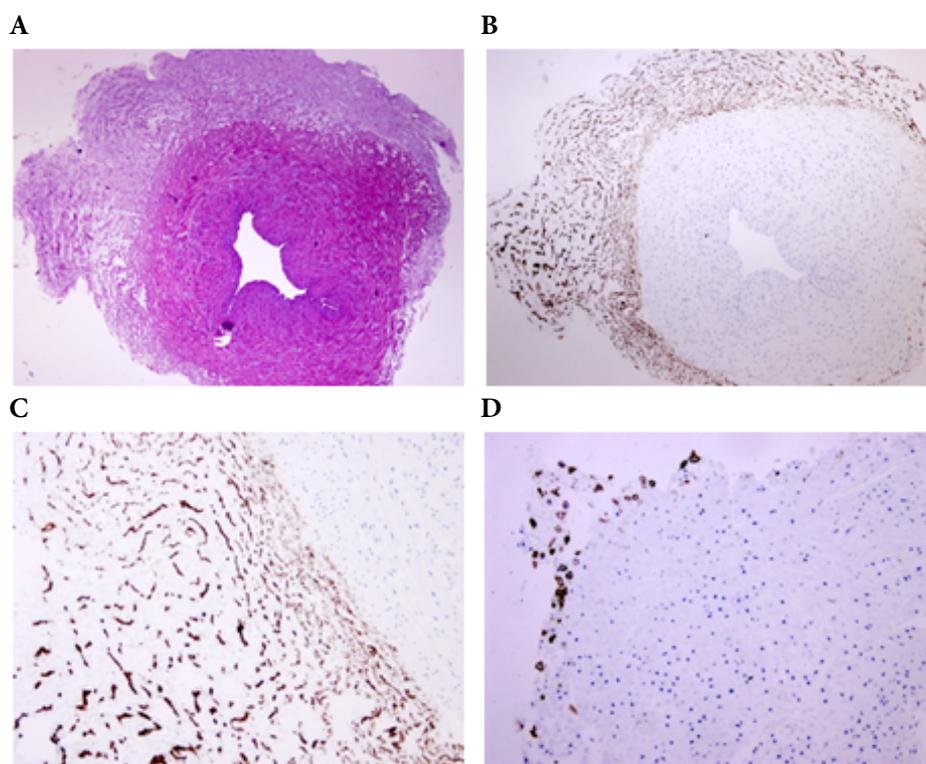


Figura 4.8: Corte transversal de la arteria del cordón umbilical antes y después del tratamiento enzimático A, tinción en hematoxilina y eosina; B, tinción con anticuerpo anti-CD10 y (C), tinción con anticuerpo anti-CD10 en cortes de la arteria del cordón umbilical antes del tratamiento enzimático. D, tinción con anticuerpo anti-CD10 Corte transversal de la arteria del cordón umbilical después del tratamiento enzimático. Aumento 10×.

(Figuras 4.10B y 4.10G) y porque células en cultivo adquieren la expresión de CD68 (Figura 4.10I). Hemos usado la tinción con Ki-67 (Figura 4.10D) como control de especificidad y no hemos detectado tinción cuando hemos usado controles de isotipo.

A modo de resumen en la Tabla 4.1 se recoge la valoración en términos de porcentaje e intensidad de expresión para todas las inmunotinciones realizadas sobre secciones del cordón umbilical y sobre las células UCSSC cultivadas. La expresión de CD10, queratina, caldesmon, desmina y vimentina tanto en las células UCSSC

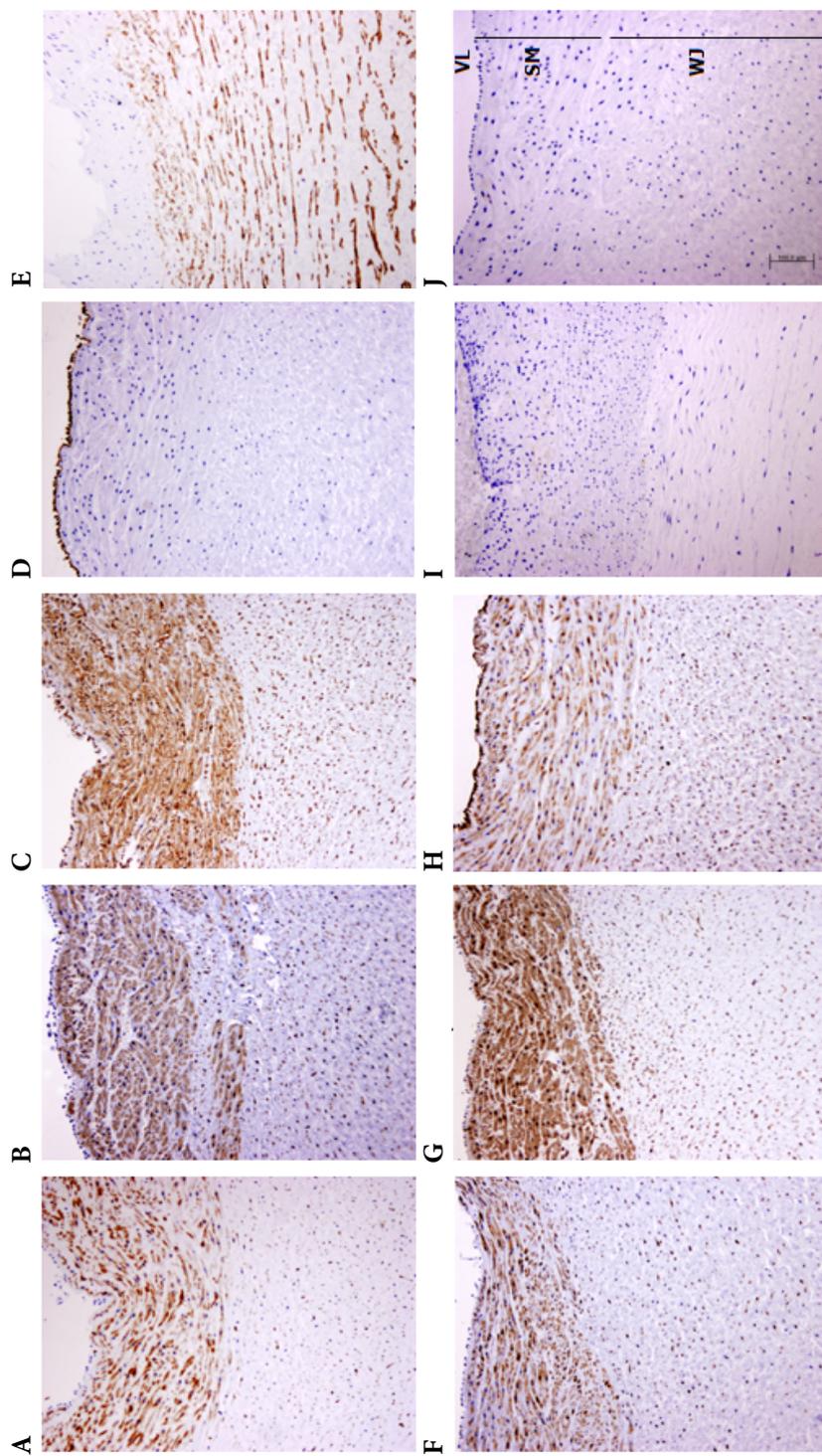


Figura 4.9: Caracterización *in situ* de células UCSSC por inmunohistoquímica en secciones transversales de cordón umbilical teñidas con varios anticuerpos utilizando el método polímero peroxidasa. A, queratinas; B, SMA; C, caldesmon; D, CD34; E, CD10; F, Desmina; G, actina específica; H, vimentina; I, CD68 y J, controles de isotipo. Imágenes tomadas a un aumento de 10×. VL: luz del vaso; SM: células de músculo liso; WJ: Gelatina de Wharton.

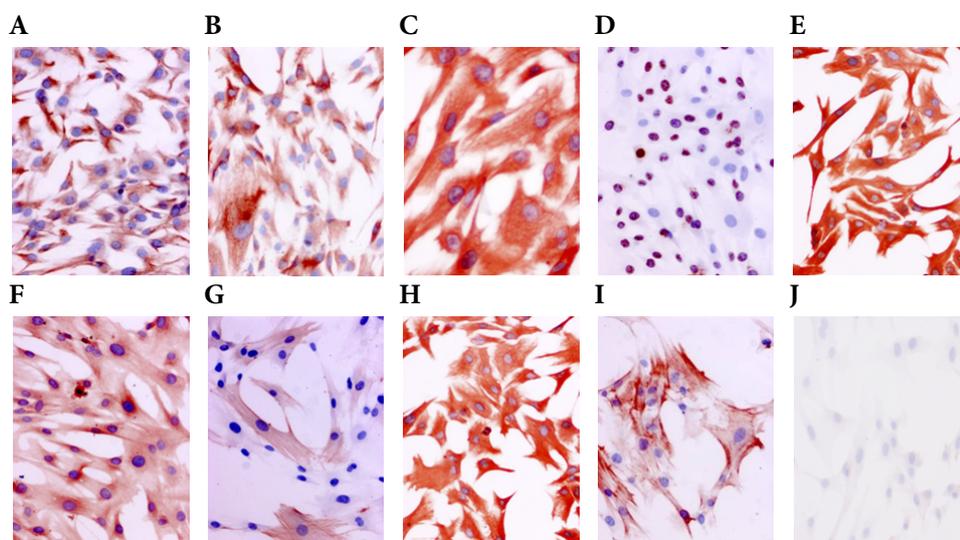


Figura 4.10: Caracterización inmunocitoquímica *in vitro* de células UCSSC cultivadas. Las tinciones se han realizado por el método de la polímero peroxidasa. A, Queratinas; B, SMA; C, caldesmon; B, Ki-67; E, CD10; F, Desmina; G, actina específica; H, vimentina; I, CD68 y J, controles de isotipo. Imágenes obtenidas a aumentos del 100× excepto para el caldesmon a 200×.

cultivadas como las presentes en el estroma *in situ* presentan una intensidad y porcentaje similar. La expresión de actinas ha sido mayor en células UCSSC *in situ*, alrededor de 90-100 %, que en las UCSSC cultivadas, 20–30 %. La expresión de podoplanina también es menor en las células UCSSC cultivadas, $2,8 \pm 1,9$ %, que en las células UCSSC *in situ* $36,0 \pm 31,8$ %.

También se ha estudiado el fenotipo mediante citometría de flujo en seis líneas de UCSSC independientes, todas ellas cultivadas tanto en condiciones de hipoxia (5 % O₂), como en condiciones de normóxia (21 % O₂). En la Figuras 4.11 y 4.12 hemos representado en forma de histogramas el fenotipo encontrado. Las células UCSSC cultivadas son positivas para CD10, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105 y SMA (Figuras 4.11A y 4.12A; 4.11B y 4.12B; 4.11C y 4.12C; 4.11D y 4.12D; 4.11E y 4.12E; 4.11F y 4.12F; 4.11G y 4.12G; 4.11H y 4.12H respectiva-

Tabla 4.1: Valoración del inmunofenotipo de las células presentes en las secciones de cordón umbilical y de células UCSSC cultivadas.

	Endotelio		Músculo liso		UCSSC <i>In situ</i> ^b		Subamnióticas		UCSSC cultivadas	
	%	I ^a	%	I ^a	%	I ^a	%	I ^a	%	I ^a
CD45	0±0	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-
CD68	0±0	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-	10,4±3,2	+
CD31	100±0	++	0±0	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-
CD34	100±0	+++	0±0	-	0±0	-	0±0	-	0±0	-
CD10	0±0	-	0±0	-	97,4±1,5	++/++++	38±8,4	+	98,8±1,2	++
Queratina	0±0	-	99,2±0,8	++/++++	75,2±19,6	++/++++	38,6±0	++	89,2±4,3	++/++++
SMA	0±0	-	99,2±0,8	++	94±4,6	++	0±0	-	33±6,6	++
Sp Actina	0±0	-	100±0	+++	95,6±4,4	+++	0±0	-	22,8±4,3	++
Caldesmon	0±0	-	100±0	++/++++	93,2±4,8	++/++++	0±0	-	100±0	+++
Desmina	0±0	-	62±15,7	++/++++	66,8±16,4	++	0±0	-	89,2±6,5	++/++++
Podoplanina	0±0	-	0±0	-	36,6±31,8	++	1,6±2,6	-	2,8±1,9	++
Vimentina	100±0	+++	100±0	+++	100±0	+++	0±0	-	100±0	+++
Ki67	0±0	-	0,8±1,8	++	0,2±0,45	++	0,2±0,45	++	41,8±6,3	+++

^a I, valoración de la intensidad de la coloración: ausente (-) a intensa (++++).

^b Células presentes en la zona digerida durante el proceso de purificación de las células UCSSC y que logran adherirse y crecer en placa de cultivo. La expresión de marcadores se ha cuantificado en células en el pase 9.

mente) y negativas o con muy baja positividad para CD31 (Figuras 4.11I y 4.12I), CD14 y CD45 (Figuras 4.11L y 4.12L).

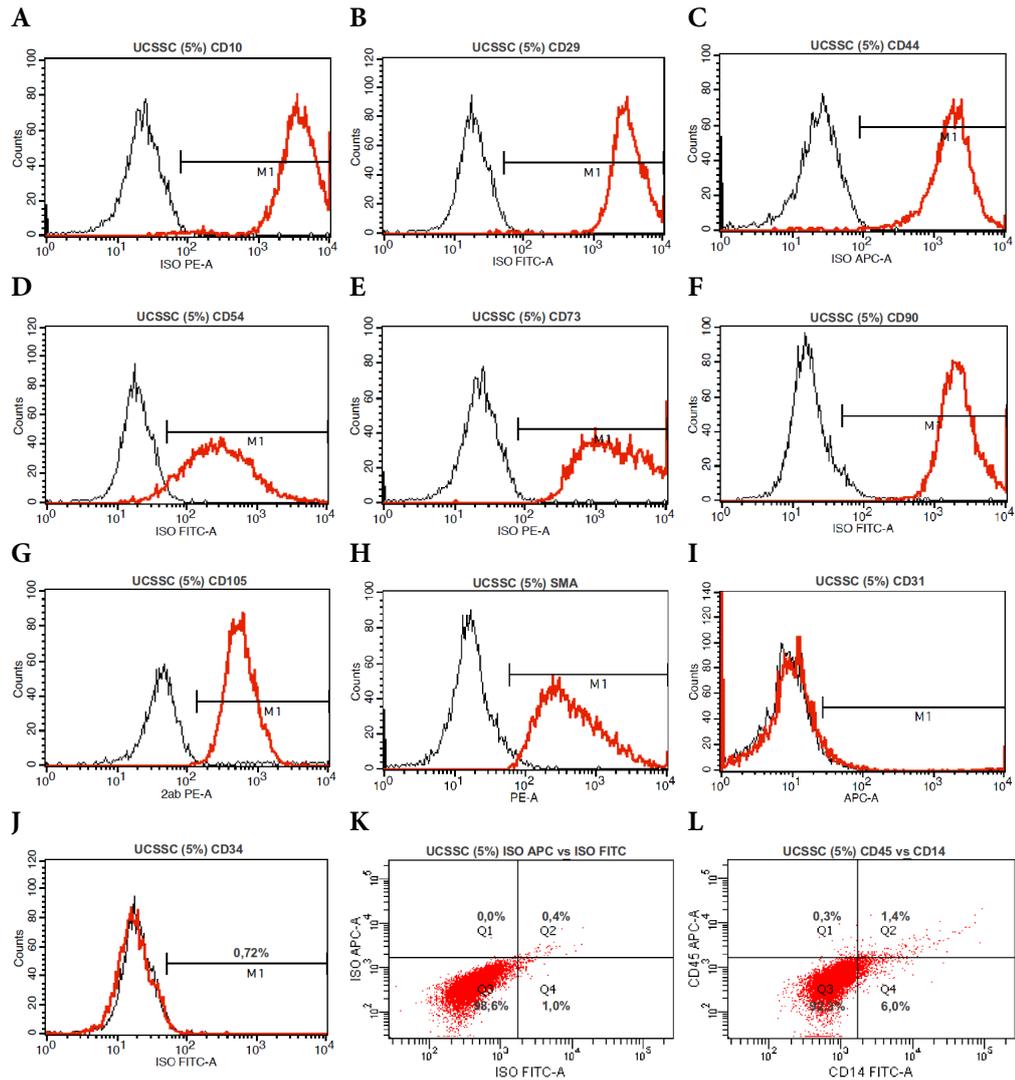


Figura 4.11: Análisis por citometría de flujo de antígenos de membrana en células UCSSC cultivadas a 5 % O₂ a pases 3-5. Un mínimo de 10.000 eventos se han utilizado para el análisis usando el programa Cell Quest Pro (BD).

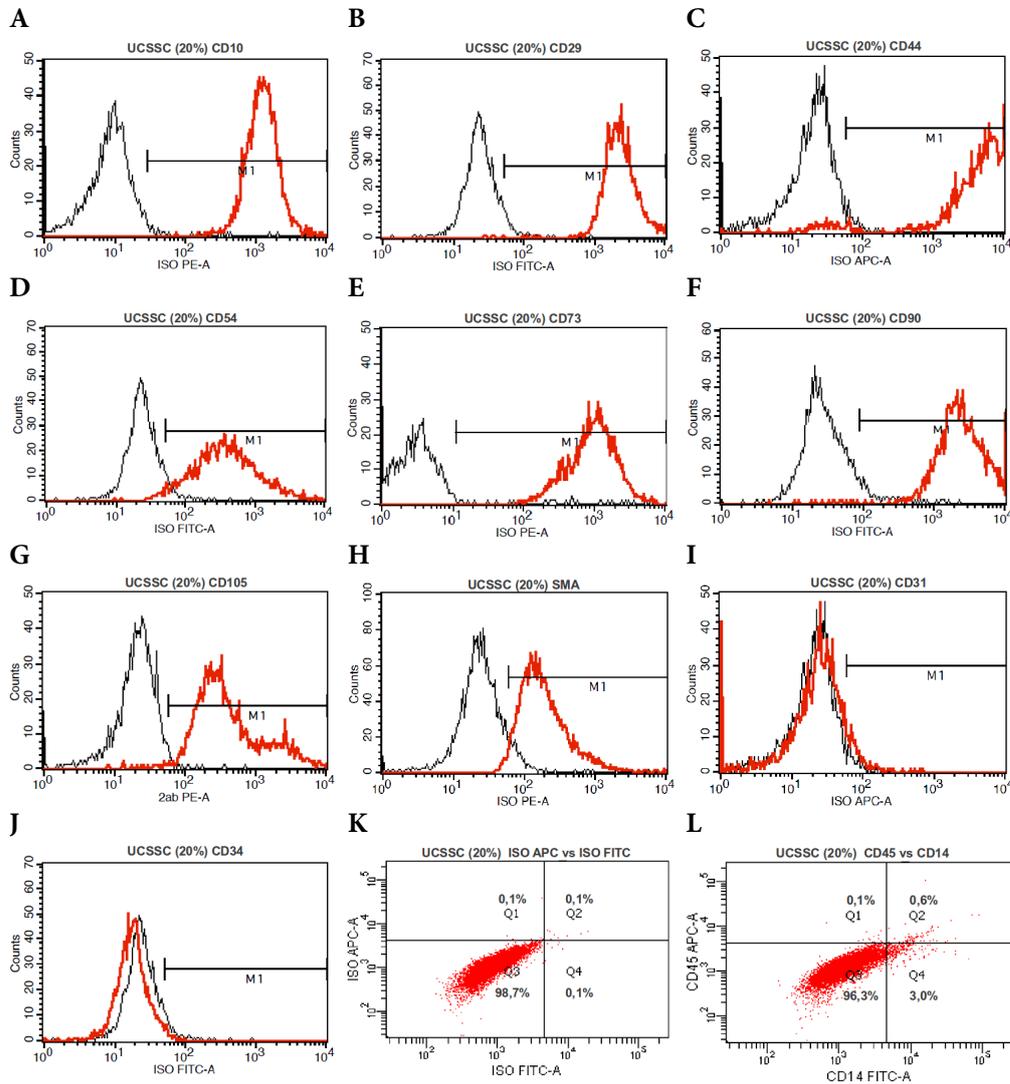


Figura 4.12: Análisis por citometría de flujo de antígenos de membrana en células UCSSC cultivadas a 21 % O₂ a pases 3-5. Un mínimo de 10.000 eventos se han utilizado para el análisis usando el programa Cell Quest Pro (BD).

4.1.4 Expresión de marcadores de pluripotencialidad

Con el objetivo de avanzar en la caracterización de las líneas celulares obtenidos se ha estudiado por PCR la expresión de factores de transcripción que tienen relación con el mantenimiento de la pluripotencialidad en células embrionarias

humanas. Los resultados obtenidos muestran que las células UCSSC son claramente positivas para *POU5F1*, *NANOG*, *KLF4*, *MYC*, *SOX2*, *SALL4* (Figura 4.13).

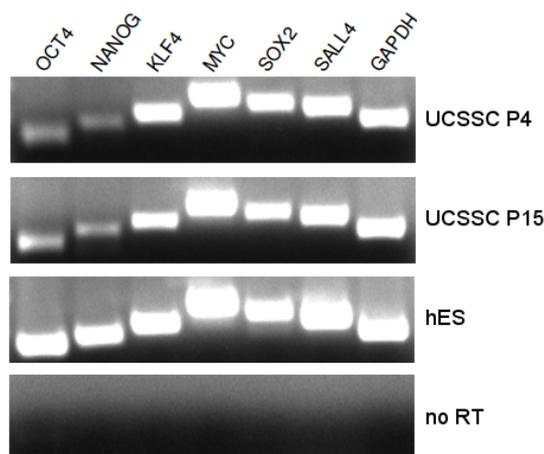


Figura 4.13: Expresión de factores de transcripción relacionados con la pluripotencialidad.

4.1.5 Estudio de la multipotencialidad de células UCSSC cultivadas en hipoxia

En esta memoria también se ha abordado el estudio de las potencialidades de diferenciación de las células UCSSC cultivadas en hipoxia. Para ello, hemos inducido la diferenciación de estas células hacia adipocito, condrocito y osteocito. La diferenciación adipogénica se ha verificado mediante tinción de las inclusiones lipídicas con *Oil red O*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.14A. En ella se observa en rojo las inclusiones lipídicas.

Mediante el método de *Von Kossa* se ha puesto de manifiesto la diferenciación osteogénica, ya que mediante esta técnica se tiñen los depósitos de calcio, Figura 4.14B.

Finalmente, tras tres semanas de inducción hacia la condrocito se obtuvo un botón celular blanquecino y de aspecto brillante como el que se puede ver en la Figura 4.14C y, tras el corte del mismo, se obtuvo la imagen de la tinción del colágeno II con azul de alcian, Figura 4.14D.

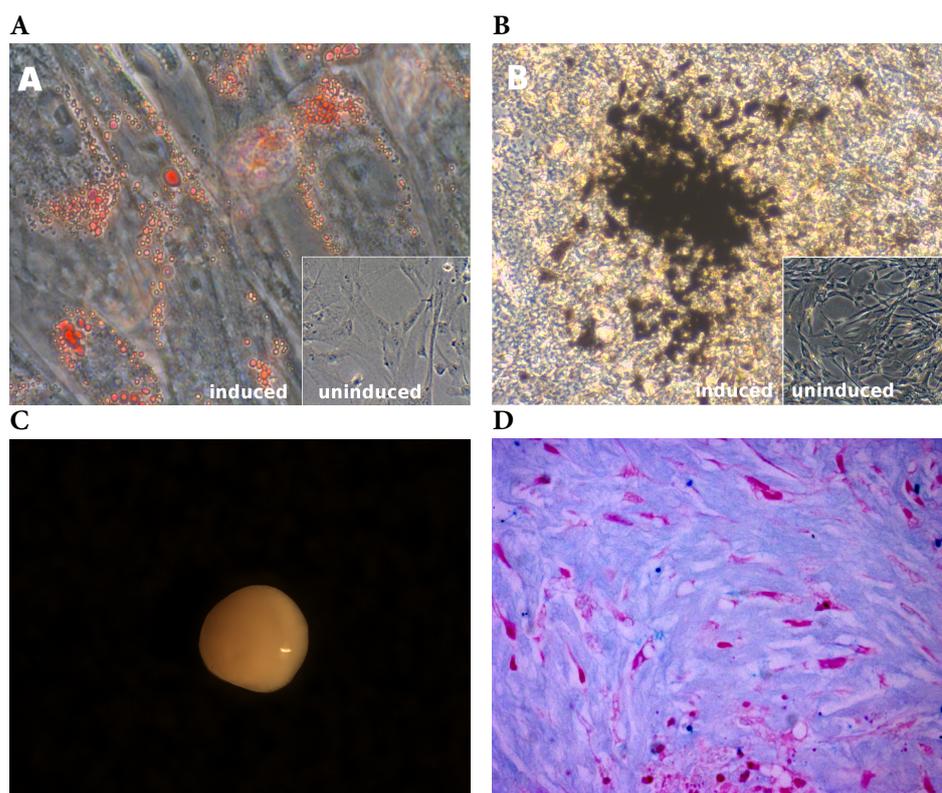


Figura 4.14: Diferenciación *in vitro* de células UCSSC. A, UCSSCs tras inducción adipogénica, las inclusiones lipídicas aparecen teñidas en rojo; B, UCSSC tras inducción osteogénica, el depósito de calcio se muestra teñido en color marrón; C, Pellet formado por células UCSSC tras inducción condrogénica; D, Corte histológico del botón celular de UCSSC tras inducción condrocítica, en la imagen el colágeno aparece teñido en rosa.

4.1.6 Ultra estructura y actividad contráctil de las UCSSC

El estudio de la ultraestructura de las células UCSSC cultivadas ha permitido demostrar que estas células son fusiformes, poseen un retículo endopasmá-

tico rugoso prominente, un aparato de Golgi modesto y las mitocondrias están bien desarrolladas. Además, se han podido identificar miofilamentos con acúmulos focales de mayor densidad ubicados en la periferia y fibronexos constituidos de miofilamentos y uniones gap (Figuras 4.15D – E), que son características ultraestructurales de células miofibroblásticas.

Las imágenes de microscopía electrónica y la expresión de actina de músculo liso (SMA) de estas células sugieren la posible existencia de un fenotipo funcional. Por ello, se ha estudiado el efecto de citoquinas capaces de inducir contracción o relajación del volumen de células miofibroblásticas. Entre ellas, se ha estudiado el efecto de PDGF, *TGFβ1* y *IL10*. Para ello, las células UCSSC fueron incluidas en matrices de colágeno que permiten medir los efectos de contracción o relajación a través de la variación en el volumen de la gota de colágeno gelificada.

Los resultados de estos estudios muestran que *TGFβ1* y PDGF inducen la contracción del volumen de la gota. Además, de extensión de la contracción es directamente proporcional a la dosis de citoquina administrada, Figura 4.15A y B). Por otra parte, *IL10* induce la relajación celular y, por tanto, el aumento del volumen de la gota, Figura 4.15C.

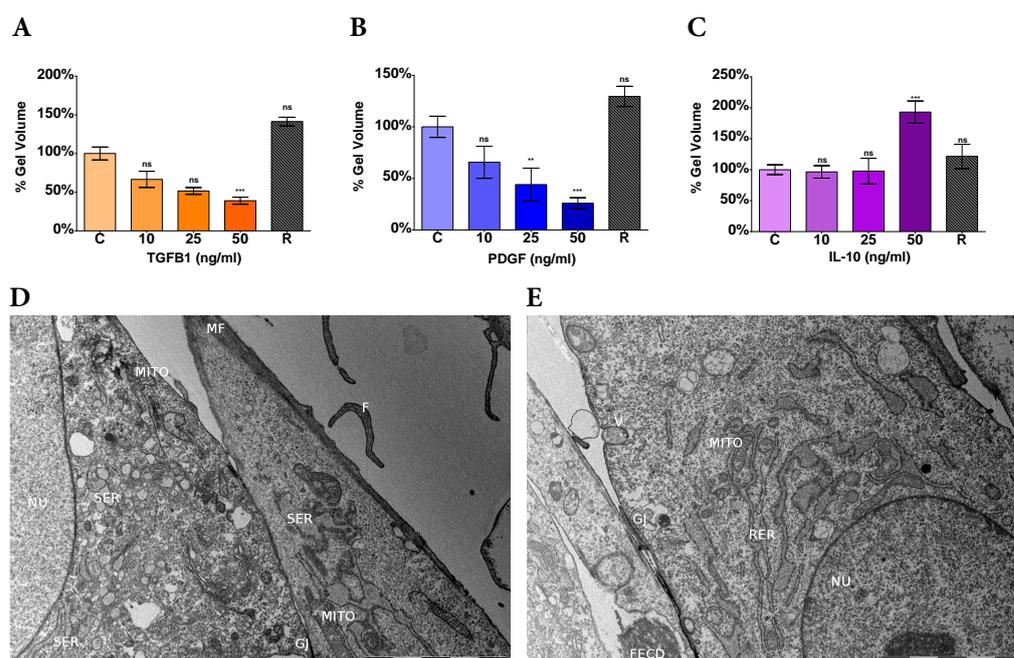


Figura 4.15: Capacidad contráctil de las células UCSSC. A Efecto del TGFβ1. B, Efecto del PDGF; C, Efecto de la IL10; D y E, Imágenes de microscopía electrónica.

4.2 Cultivo, crecimiento y diferenciación de células estromales sobre TCA

4.2.1 Las células UCSSC se adhieren a las telas de carbón activado y proliferan

Las células UCSSC transducidas con GFP se adhieren a las fibras de carbón y crecen sobre ellas, cubriendo con gran rapidez la superficie disponible (Figura 4.16). Las imágenes secuenciales tomadas durante el período de seguimiento del crecimiento celular, 4 semanas, nos han permitido demostrar que las células crecen durante ese tiempo sin que sea posible evidenciar cambios morfológicos notables entre los elementos de la población celular adherida a las TCA. Por tanto,

estos resultados demuestran que las TCA sirven como soporte para el crecimiento celular y que la cantidad de células adheridas a ellas crece de manera continua durante el tiempo de cultivo (días 7, 11, 18 y 28) mientras que las células cultivadas sobre plástico dejan de crecer entre los días 7 y 11 debido al fenómeno de la inhibición del crecimiento por el contacto celular, y que al estar confluyente en el pozo de cultivo se despegan y mueren durante el último período del ensayo, Figura 4.16E.

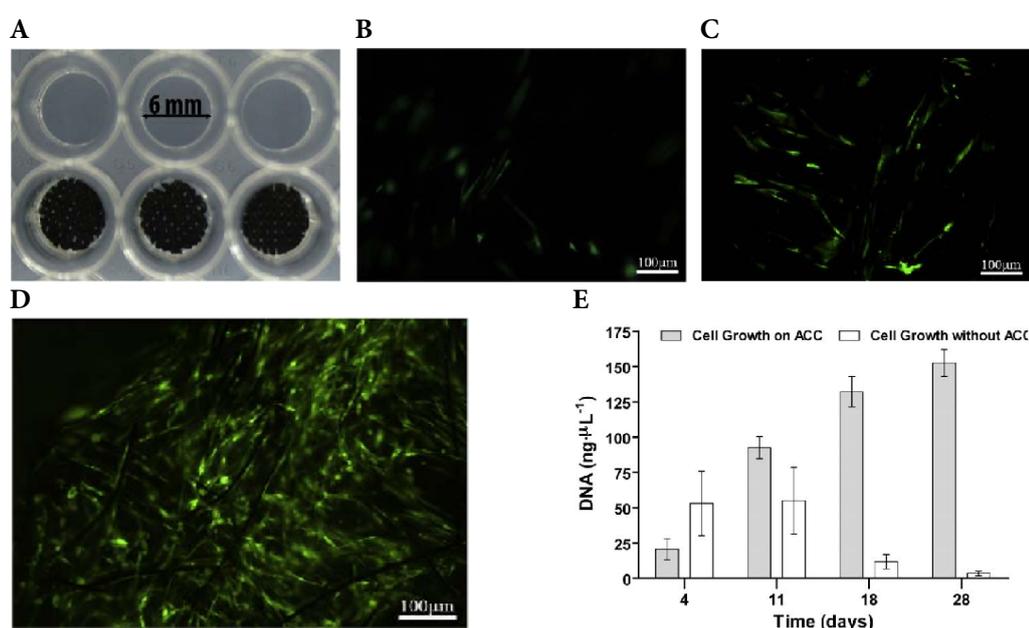


Figura 4.16: Adhesión y proliferación de células UCSSC cultivadas sobre TCA. A, Las células UCSSC fueron sembradas en TCA y sobre placas de cultivo convencionales; B a D, Células UCSSC transfectadas con GFP cultivadas sobre TCA: B, a las 24 h; C, 7 días; D 14 días. Escala = 100 μ m. E, Cuantificación del contenido de DNA en células cultivadas sobre plástico y en TCA tras 4, 11, 18 y 28 días de cultivo.

4.2.2 Diferenciación de células UCSSC cultivadas sobre TCA a osteocitos y a condrocitos

Se ha inducido la diferenciación osteogénica y condrogénica de células UCSSC no transducidas con GFP y cultivadas sobre la matriz de carbón activado. Las célu-

las inducidas a osteocito y condrocito han mostrado ser birrefringentes cuando son visualizados con radiación visible y se han mostrado autofluorescentes al ser observadas con radiación ultravioleta. Ambos fenómenos se pueden observar en las Figuras 4.17A – D y Figura 4.18, respectivamente. La autofluorescencia observada en las células diferenciadas a osteocitos es debida a de la secreción de hidroxapatita cálcica y en el caso de las células diferenciadas a condrocitos a la secreción de colágeno. La presencia de hidroxapatita cálcica sobre la superficie de la TCA se ha determinado por difracción de rayos-X. Mediante la detección de los picos que se muestran en la Figura 4.17G, las cuales corresponden, exactamente, con los de ese mineral. Además los resultados cuantitativos de la cantidad de Ca^{2+} extraído de las TCA, revelan la existencia de este catión y un ligero incremento de su concentración durante la fase final del cultivo de las células (Figura 4.17H), sugiriendo que los osteocitos diferenciados seguían viables y funcionalmente activos durante todo el tiempo de ensayo.

4.3 Radiosensibilidad celular y sensibilidad a los experimentos de transferencia de medio

4.3.1 Supervivencia celular tras irradiación

Los modelos de muerte celular por radiación se suelen ajustar a las curvas que se muestran en la Figura 4.19, siendo posible dos descripciones de la forma de las curvas de supervivencia: 1) para las células humanas más sensibles, la curva de supervivencia representada en coordenadas semilogarítmicas se ajusta a una función exponencial decreciente (una línea recta en la representación); 2) aunque algunos

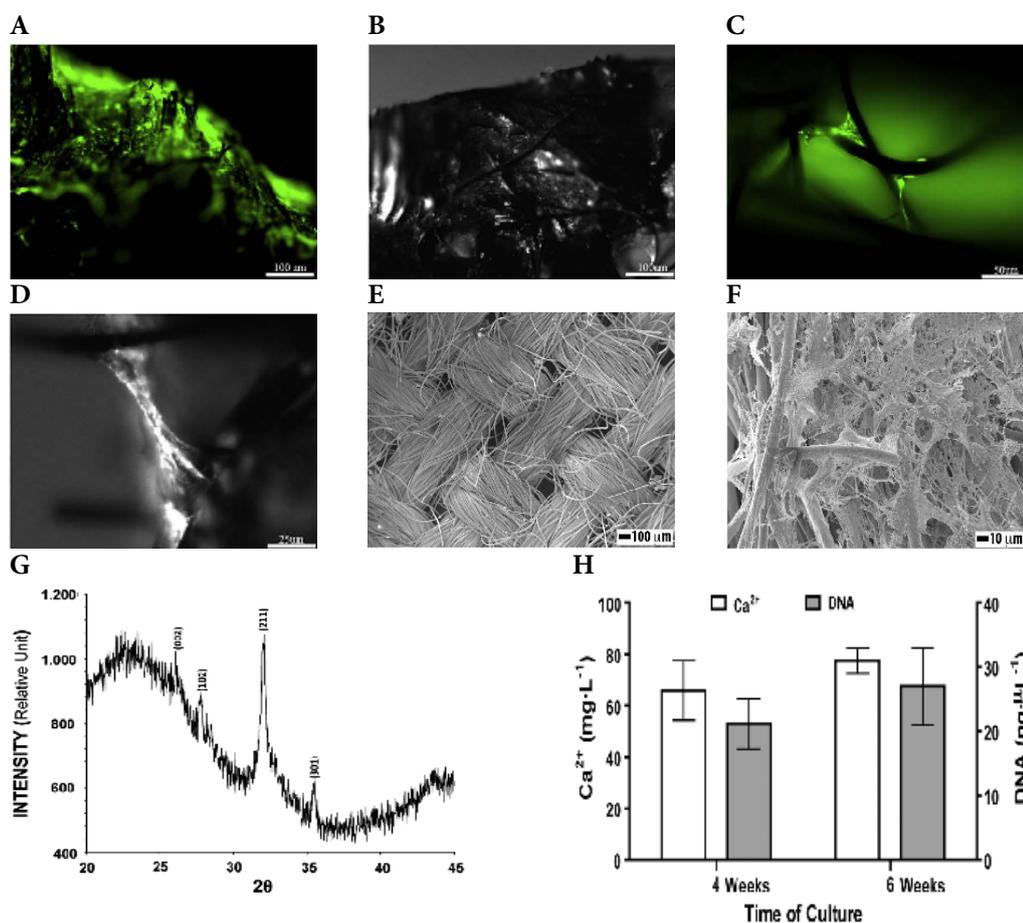


Figura 4.17: Diferenciación osteogénica de células UCSSC en TCA. A a D, Microfotografías ópticas demostrativas de la fluorescencia de osteocitos cultivados en TCA tras 6 semanas de cultivo; E, Microfotografía SEM de la TCA sin células; F, Microfotografía SEM de la TCA con células UCSSC diferenciadas a osteocitos; G, Los estudios de difracción de rayos-X de las TCA evidencian que los nódulos mineralizados son depósitos de hidroxapatita (las difracciones principales de hidroxapatita cálcica son 002, 102, 211, 301) y H, Valore de Ca²⁺ tras 4 y 6 semanas de cultivo.

datos experimentales se ajustan a este modelo satisfactoriamente, muchos otros conjuntos de datos, en particular los que corresponden a los estudios de radiosensibilidad de las células tumorales, se ajustan mejor a una curva con una pendiente inicial finita y alguna forma de curvatura posterior [201].

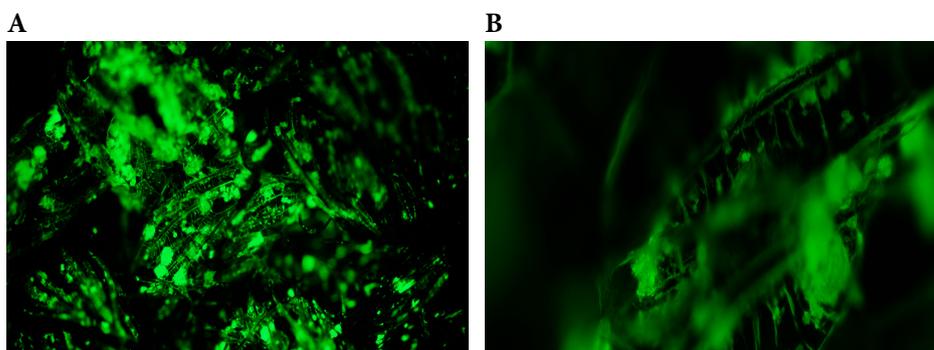


Figura 4.18: Células UCSSC a los 14 días de inducción a condrocitos. B, Detalle de la formación de matriz extracelular recubriendo las fibras de la TCA.

Los resultados obtenidos confirman que las células UCSSC se ajustan al modelo exponencial que se describe mediante Ecuación 4.1 y que se caracteriza por el parámetro α , la pendiente de la recta:

$$S = e^{-\alpha D}; D_0 = \frac{1}{\alpha} \quad (4.1)$$

donde S es la fracción de células que sobreviven a la dosis D , α es la pendiente y D_0 es el valor recíproco de la pendiente y corresponde a la cifra que estadísticamente representa la dosis letal media; es decir, la dosis necesaria para causar una media de un evento de interacción letal por célula. Las curvas de supervivencia para células de melanoma irradiadas *in vitro* son, sin embargo, convexas y se ajustan al modelo lineal-cuadrático (LQ) de la supervivencia celular tras irradiación, que viene dado por la siguiente ecuación de supervivencia celular [179]

$$S = e^{-\alpha D + \beta D^2} \quad (4.2)$$

Las curvas de supervivencia celular tras la irradiación se han representado en las mismas figuras en escala semilogarítmica. Ambas curvas, la puramente exponencial para las células UCSSC y la lineal-cuadrática para las células de melanoma,

describen con precisión la respuesta celular a la radiación para dosis situadas por encima de 1 Gy. Las fracciones de supervivencia a 2 Gy han sido de $26,9 \pm 1,8$ y $21,2 \pm 2,1$ para células UCSSC frente a $64,8 \pm 3,2$ y $59,7 \pm 2,3$ para células de melanoma. Para dosis por debajo de 1 Gy, sin embargo, nuestros resultados parecen ajustarse al fenómeno de hipersensibilidad a baja dosis [202]. Los parámetros de la supervivencia celular clonogénica correspondientes a las curvas de supervivencia para las dos líneas de melanoma (A375 y G361) y las células UCSSC (líneas UCSSC 35 y UCSSC 37) tras la irradiación se han resumido en la Tabla 4.2 y en las Figuras 4.19A y 4.19B.

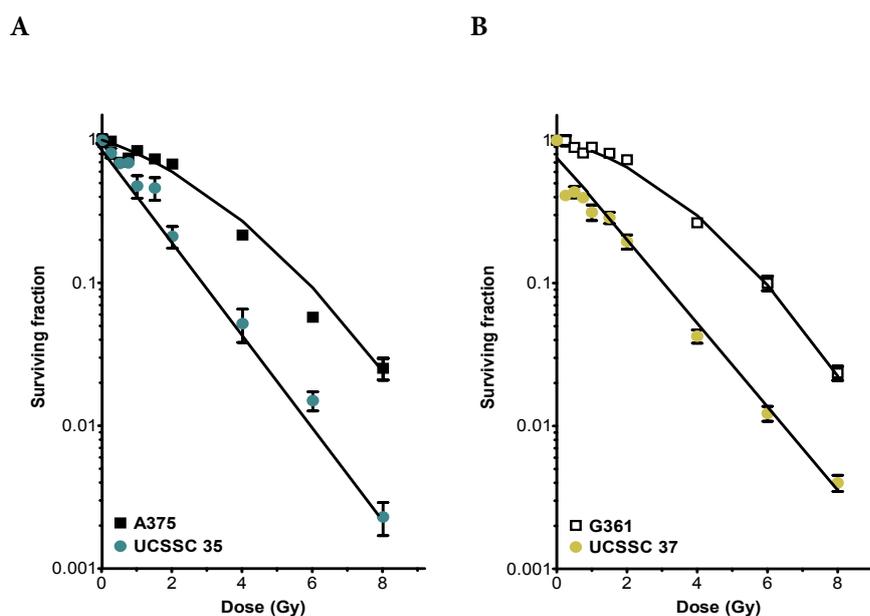


Figura 4.19: Curvas de la dosis-respuesta clonogénica en células tumorales y troncales directamente irradiadas. A, Líneas celulares de melanoma A375 and y de célula madre UCSSC 35; B, líneas celulares de melanoma G361 y de célula madre UCSSC 37

Tabla 4.2: Valores característicos de las líneas celulares usadas

Parámetros de radiosensibilidad					
Línea celular	σ (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	SF ₂ (%)	D ₀ (Gy)	Eficiencia
G361	0,131 ± 0,023	0,043 ± 0,003	64,8 ± 3,2	3,52	29,3 ± 2,5
A375	0,187 ± 0,057	0,035 ± 0,008	59,7 ± 2,3	3,15	58,8 ± 3,2
UCSSC 35	0,657 ± 0,018	-	26,9 ± 1,8	1,51	14,7 ± 1,3
UCSSC 37	0,754 ± 0,043	-	22,1 ± 2,1	1,33	15,0 ± 0,6
Parámetros del efecto de vecindad					
Línea celular	χ_{max} (%)	K _{By} (Gy)	S - Z _R ^a (max)	S - Z _R ^a (2 Gy)	Apoptosis
G361	38,1 ± 2,8	0,29 ± 0,09	0,25 (1 Gy)	0,22	+
A375	47,6 ± 3,3	0,23 ± 0,10	0,31	0,25	+++
UCSSC 35	0,0 ± 0,00	-	-	-	-
UCSSC 37	0,0 ± 0,00	-	-	-	-

^a S - Z_R: Diferencias entre valores teóricos de acuerdo con la ecuación 5.1 y los valores experimentales de la supervivencia celular tras irradiación ajustados al modelo lineal-cuadrático. Las diferencias máximas se indican junto con el valor de la dosis a la que se producen. Las diferencias a 2 Gy también se indican.

4.3.2 Velocidad de reparación de las roturas de doble cadena de ADN

Tras la inducción del daño, se activan diversos mecanismos cuyo objetivo es reparar las lesiones del ADN, en un intento de restaurar la secuencia genética a su estado original. Las Figuras 4.20A y B ilustran la cinética de reparación del ADN para los dos modelos celulares estudiados, la cantidad de daño existente en función del tiempo se ha medido a través de la disminución del momento de la cola del cometa. Para evaluar este proceso cuantitativamente hemos usado la medida del momento de la cola tras 4 horas de reparación en comparación con el valor inicial. Estos parámetros, expresados como el valor medio ± desviación estándar, fueron de 10,6 ± 2,6% y 40,32 ± 6,97% para las células de melanoma y de 50,67 ±

6,97% y $67,2 \pm 9,4\%$ para células UCSSC ($P < 0,001$ y $P < 0,05$). Estos resultados muestran con claridad que las células tumorales reparan el daño al ADN más rápidamente que las células UCSSC. Figuras 4.20A y B.

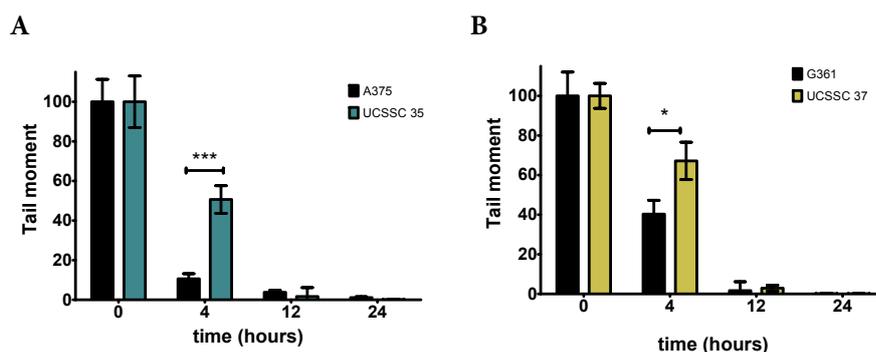


Figura 4.20: Cinética de reparación de las roturas dobles de cadena de ADN tras 6 Gy de dosis en células UCSSC y células de melanoma (A375 y G361). (A) y (B) En los histogramas se ha representado el valor medio \pm SE de, como mínimo, dos experimentos (cada uno por duplicado) para cada línea ($P < 0,05$; $P < 0,001$)

4.3.3 Experimentos de transferencia de medio

Una característica clave de la respuesta de las células a los efectos de vecindad, en contraposición a como responden frente a la acción directa de la radiación, es la relación de dosis-respuesta, sufriendo un fenómeno de saturación a dosis relativamente bajas (Figura 4.21A). Esto puede sugerir una interacción entre un receptor y su correspondiente ligando. La interacción entre receptor y ligando tiene la característica de ser a la vez dinámica y reversible. En equilibrio, aunque las concentraciones de receptor y ligando libres y receptores y ligandos unidos sean constantes, las moléculas libres y unidas están constantemente transformándose unas en las otras. De acuerdo con la ley de acción de masas, las concentraciones iniciales de

receptor y de ligando determinan la posición de equilibrio.



Como la muerte celular es el punto final para el análisis en nuestro estudio, de acuerdo con nuestra hipótesis, llamemos $[R]$ a la concentración del receptor de muerte celular, $[L]$ a la concentración del ligando, $[RL]$ al complejo formado y χ el producto de la reacción de enlace entre el receptor y el ligando. Este producto es en nuestro caso la muerte celular.

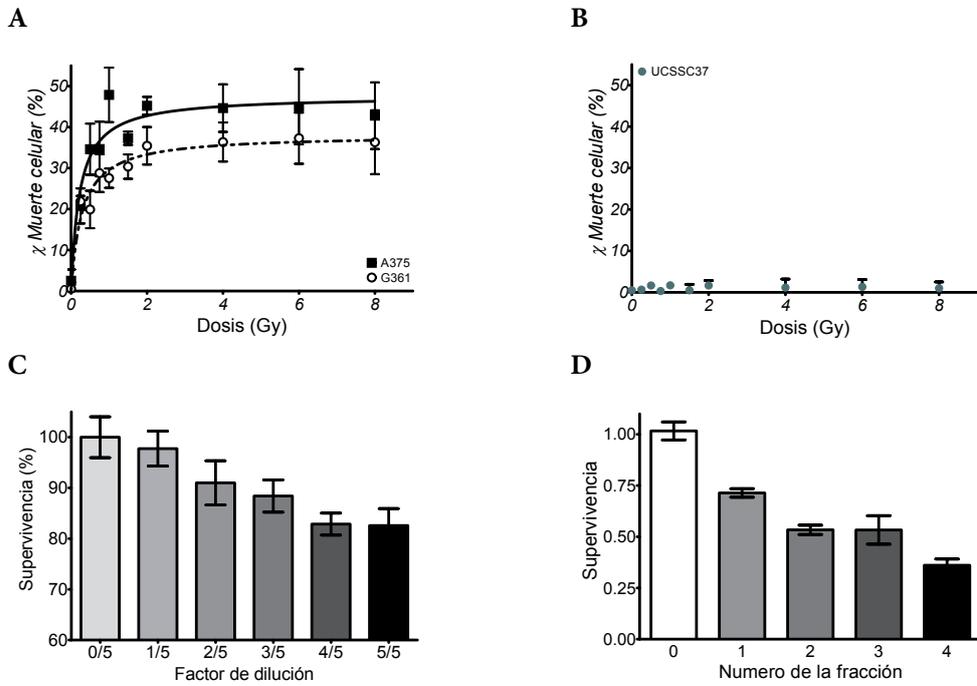


Figura 4.21: Estudio del efecto de vecindad mediante experimentos de transferencia de medio. A, las células de melanoma son sensibles al MC; B, mientras que UCSSC 35 (\square) y UCSSC 37 (\blacksquare) no son sensibles al MC; C, efectos del MC usados en diluciones sucesivas para estudiar la capacidad clonogénica de células A375 y; D, tratamiento reiterado con MC de células A375, 4 veces en intervalos de 24 horas sobre células A375.

En células de melanoma la tasa de muerte celular, χ , aumenta concomitante-mente con la dosis (Gy) hasta alcanzar un valor máximo (Figura 4.21A). Ahora

debemos considerar que la concentración del receptor se debe tomar como constante para cada punto experimental porque el número de células en todos los casos es constante. Sin embargo, la concentración del ligando en el medio condicionado por células irradiadas depende de la dosis con que las células han sido tratadas y de la capacidad de estas células para secretar ligandos de muerte celular. Por lo que, dado que la concentración de R es constante y la de L , puesto que depende de un lado de la cantidad de lesiones inducidas por la radiación y de la puesta en marcha de mecanismos de repuesta capaces de inducir procesos de secreción activos y, de otro, de la fracción de células que resultan letalmente lesionadas, y ambos fenómenos – secreción activa y muerte celular – son dependientes de la dosis y mutuamente exclusivos, es razonable presumir que ocurra una saturación en el proceso.

La fórmula para este modelo matemático es

$$\chi = \chi_{max} \times \frac{D}{K_{By} + D} \quad (4.4)$$

Esta ecuación describe la unión de un ligando a su receptor de acuerdo con la ley de acción de masas. En esa ecuación χ representa la muerte celular, χ_{max} es la máxima muerte celular que puede ser medida en las condiciones en las que el experimento se desarrolla, D la dosis aplicada para obtener el medio condicionado por la irradiación (MC) y K_{By} (la constante de asociación entre receptor y ligando) que en este caso puede entenderse como la dosis administrada para generar un medio MC capaz de causar una tasa de muerte celular correspondiente a la mitad de la tasa máxima. Hemos tomado este valor como un indicador (medido en unidades equivalentes a Gy) de la sensibilidad del modelo celular al efecto de vecindad. De acuerdo con este razonamiento, valores bajos de K_{By} corresponden a

células más sensibles y valores de K_{By} más elevados a células más resistentes. Los valores de χ_{max} y K_{By} se han resumido en la Tabla 4.2. De ellos, se deduce que la línea celular A375 es ligeramente más sensible a los efectos de vecindad que la línea celular G361 ($K_{By} = 0.23$ frente a $K_{By} = 0.29$ Gy) y que las células UCSSC (líneas UCSSC 35 y UCSSC 37) son insensibles al MC generado a partir de células de melanoma (Figura 4.21B).

4.3.4 Fraccionamiento en el efecto de vecindad

Los resultados descritos nos han llevado a realizar dos experimentos diferentes para estudiar con mayor profundidad la relación de la dosis administrada con el efecto bystander producido. Inicialmente hemos medido el efecto del medio MC (obtenido tras irradiación de células A375 a dosis de 6 Gy) mediante diluciones sucesivas con medio nutriente fresco (Figura 4.21C) sobre la capacidad clonogénica de las células A375 no sometidas a ningún tipo de tratamiento. Un análisis de esta figura revela que cuanto mayor es la dilución menos intenso es el efecto de vecindad. Por otra parte como entre concentración de medio MC y efecto de vecindad existe una clara relación de dependencia podemos concluir que los datos de nuestros experimentos demuestran que el porcentaje de muerte celular por unidad de concentración de ligando presente en el medio MC añadido a las células no-irradiadas es constante. Esta proporción queda cuantificada por el valor de la pendiente de la recta de regresión lineal que resulta ser de, aproximadamente, el 20 % por unidad de concentración ($k = 19,5\%$; $P < 0,001$). Para ello hemos ensayado el tratamiento reiterado de células A375 con medio MC (de 0 a 4 veces cada 24 horas) aplicados sobre un conjunto de cajas de cultivo cuyas células

fueron sembradas en la misma cantidad y al mismo tiempo (Figura 4.21D). Los datos experimentales obtenidos quedan resumidos en la Figura 4.21D muestran que cada fracción de tratamiento produce un decrecimiento de la supervivencia clonogénica de las células A375 no-irradiadas que es progresivo y dependiente del número de tratamientos efectuados. Utilizando un modelo puramente exponencial para el ajuste de la relación entre número de fracciones de tratamiento y efecto cuantificable como supervivencia celular, hemos podido demostrar que la relación investigada es estadísticamente significativa ($P < 0,001$) y que cada fracción de tratamiento produce una reducción de la supervivencia que es constante y que, para las células A375 se sitúa en torno al 24 % de las células inicialmente sembradas.

4.3.5 Análisis de la muerte por apoptosis

Tras los experimentos de transferencia de medio hemos verificado si la muerte celular mediada por la interacción entre los factores solubles presentes en el medio MC y su receptor en la membrana de las células tumorales se daba a través de una ruta apoptótica. Los resultados parecen corroborar que la pérdida en la capacidad clonogénica en ambas líneas de células de melanoma, A375 y G361, se deben a un proceso apoptótico típico. Este hecho se pone de manifiesto en la Figura 4.22A para las células A375 en los histogramas de citometría de flujo y en la relación de dosis-respuesta encontrada entre la dosis de radiación utilizada para producir el medio MC y la proporción de células en sub-G1 (Figuras 4.22B y C). Las diferencias entre el control y los grupos irradiados a 1 y 2 Gy son estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

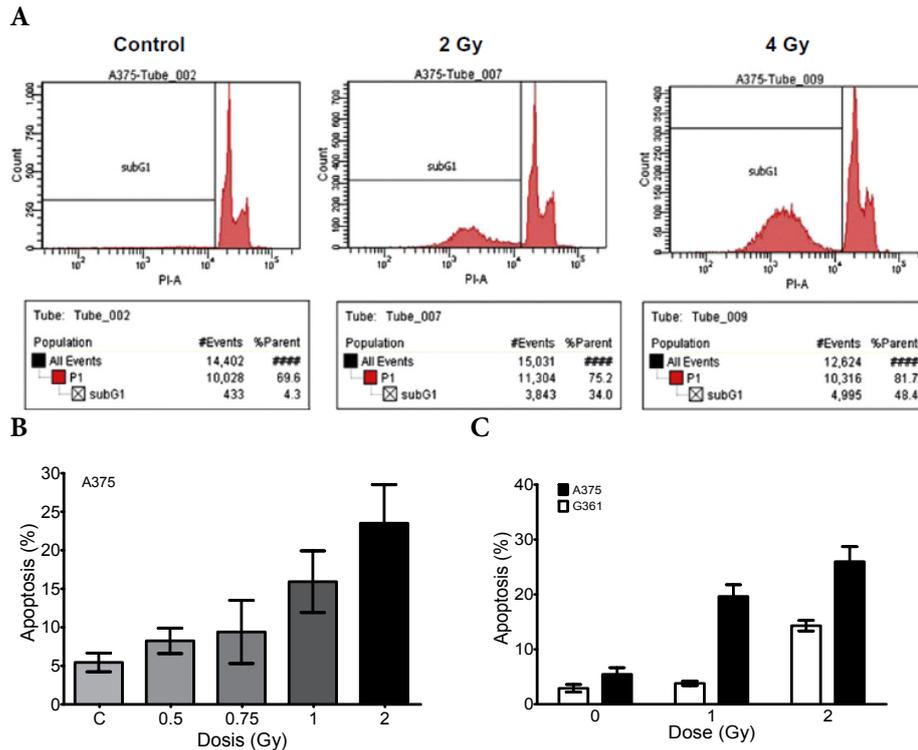


Figura 4.22: Células apoptóticas hipodiploides detectadas por citometría de flujo tras el tratamiento de células de melanoma con medio MC durante 24 horas. A Histogramas de citometría de flujo de células A375 tratadas con medio MC producido a 0 Gy durante 24 horas (medio MC control) y con medio MC producido a 2 y 4 Gy. B Relación de dosis-respuesta entre la fracción de células apoptóticas y la dosis usada para producir el RMC. C Experimento de apoptosis inducida por el MC comparando las respuestas de A375 y G369.

CAPÍTULO 5

Discusión

5.1 Las células madre: clasificación, cultivo y caracterización

Muchos autores han descrito la purificación y cultivo de células madre a partir del cordón umbilical [70], de los vasos del cordón umbilical [130], o de la gelatina de Wharton [203]. Sin embargo, no ha quedado claro si estas células se originan exclusivamente a partir de la gelatina de Wharton o también a partir de las células del músculo liso de los vasos, ya que no se conoce ningún marcador característico para ninguna de ellas. Las células UCSSC *in situ* expresan actinas específicas de músculo liso, caldesmon, desmina y vimentina, coincidiendo con un fenotipo miofibroblástico [204, 205].

Las células de músculo liso vasculares presentan un fenotipo similar al de las células UCSSC *in situ*, sin embargo, en contraposición a éstas, aquéllas son negati-

vas para metalo-endopeptidasa de la membrana, conocida usualmente por CD10 (*MME*). En cultivo, las células UCSSC también han demostrado ser positivas para *MME* tanto por inmunohistoquímica como por citometría de flujo, lo que indica que provienen de la gelatina de Wharton que circunda los vasos y que no se separa completamente durante el procesamiento. La integridad de la capa de músculo liso de los vasos se preserva durante el proceso de digestión, mientras que la gelatina de Wharton perivascular se disgrega casi por completo liberando las células UCSSC que quedan suspendidas en el medio de digestión (Figura 4.8).

Cuando se compara el fenotipo de las células UCSSC en cultivo con el que se encuentra al estudiar la sección tisular del estroma del cordón umbilical, encontramos que ambos fenotipos son prácticamente coincidentes, con excepción de una bajada en los niveles de expresión de actina a pases tardíos de las células en cultivo. Aproximadamente un 10% de las células UCSSC adquirieron en cultivo, la expresión de la molécula de CD68 (*CD68*), cuya expresión es común en macrófagos y en algunas células no-hematopoyéticas como los fibroblastos [206]. Además, otros estudios han descrito la adquisición de la expresión del molécula de CD68 (*CD68*) cuando células mesenquimales obtenidas a partir del tejido adiposo se cultivan en condiciones especiales [207].

5.1.1 Características del crecimiento de células UCSSC

Las células madre mesenquimales separadas del estroma del cordón y preparadas para su cultivo inicial son insuficientes para procedimientos de terapia celular y necesitan de su expansión *in vitro*. Sin embargo, el potencial de expansión de estas células se ve limitado por la senescencia celular, que acontece como parada

irreversible del ciclo celular y que parece estar regulada por factores intrínsecos y extrínsecos [208].

Los mecanismos intrínsecos de este proceso incluyen el acortamiento de los telómeros, que es un acontecimiento normal en células somáticas, debido a que reprimen la expresión de la telomerasa, lo que resulta en la parada del ciclo celular después de un número determinado de divisiones. Este mecanismo, conocido como senescencia replicativa, normal en células somáticas, evita la inmortalización celular. Por otro lado, el estrés relacionado con las condiciones de cultivo puede inducir este fenómeno.

El cordón umbilical está compuesto por dos venas y una arteria circundadas por tejido conectivo laxo mucoso con pocas células y ausencia de capilares. A este tejido se le llama la gelatina de Wharton (Figuras 4.6, 4.7, 4.9A-J). Las células de la gelatina de Wharton dependen de la difusión de nutrientes a partir del líquido amniótico y a partir de los vasos. Las células de la gelatina de Wharton se encuentran esparcidas en toda la extensión del tejido conectivo del cordón umbilical y se sitúan a diferentes distancias de los vasos. Por ello, hemos pensado que las células UCSSC *in situ* están expuestas a presiones parciales de oxígeno muy bajas, de modo que un nivel bajo de O₂ en las condiciones de cultivo de estas células podrían mejorar las características de crecimiento de estas células. Esta hipótesis se ha confirmado al comprobar que células del mismo donante UCSSC cultivadas en hipoxia (5% de O₂) tienen mayor tasa de crecimiento y mayor potencial clonogénico que cuando se cultivan en normoxia.

En un estudio hecho por Lavrentieva y col. [209] se describe qué células UCSSC

cultivadas en condiciones hipóxicas presentan menor daño celular. Esto se podría deber a que la producción de especies de oxígeno activo en estas condiciones es reducida y consecuentemente la producción de daño celular es menor. Todo ello puede ser una posible explicación para la capacidad replicativa y el potencial clonogénico de las células UCSSC cultivadas en condiciones hipóxicas [209].

A lo largo de la realización de este trabajo experimental se ha seguido el crecimiento de 12 líneas de UCSSC obtenidas a partir de 12 cordones umbilicales independientes en medio de cultivo bajo en suero y en condiciones de hipoxia. Las células UCSSC en general han proliferado exponencialmente hasta alcanzar, aproximadamente los 50 doblamientos de la población celular inicial. De los valores del crecimiento obtenidos se ha calculado el tiempo de duplicación de estas células que ha resultado ser: T_D medio: $35,8 \pm 5,3$ horas. En un estudio reciente Sarugaser y col. [210] han estudiado los tiempos de duplicación de población en células UCSSC cultivadas a 21% de presión de oxígeno, sin factores de crecimiento, con 5% o 2% de suero y han encontrado valores de T_D de 41 ± 7 horas y 46 ± 9 respectivamente.

Cuando las células UCSSC son cultivadas en condiciones hipóxicas, con baja concentración de suero y en presencia de PDGF y factor de crecimiento epidermal (EGF), se acelera su ritmo de crecimiento lo que ocasiona la reducción de los valores del T_D . Dicho incremento en el potencial de crecimiento en condiciones hipóxicas también ha sido descrito para células MSC de médula ósea [211-213] y en células MSC de la decidua [214]. En estas condiciones, las líneas celulares de UCSSC cultivadas extensivamente, es decir, hasta alcanzar alrededor de las 50 DP son capaces de mantener un cariotipo normal y un patrón de bandas-G normal.

5.1.2 Fenotipo y potencialidades de diferenciación de las células

UCSSC

Las células UCSSC han mostrado poseer un fenotipo que es estable independiente de la concentración de oxígeno usada para su cultivo. En ambas condiciones (normoxia e hipoxia), a pasajes 3-5, el 100% de las células expresan *MME*, integrina, beta 1 (*ITGB1*), *CD44*, *NT5E*, *THY1* y *ENG* y son negativas o muy poco positivas para *CD34* y *PTPRC*. En este trabajo se ha observado además una positividad residual para *CD14* en ambas condiciones de cultivo. La pequeña fracción de células positivas para *CD14* han demostrado ser, sin embargo, negativas para *PTPRC*, lo que descarta la posibilidad de contaminación por células de estirpe hematopoyética HSC de las líneas UCSSC estudiadas.

Aunque no haya explicación clara para este resultado, se ha demostrado recientemente que la expresión de *CD14* es inducible en células MSC derivadas de tejido adiposo, lo que sugiere que un bajo nivel de expresión puede ser constitutiva en poblaciones de células MSC [207], según las condiciones de cultivo empleadas.

En un estudio reciente se ha observado una relación entre la baja presión parcial de oxígeno y la atenuación de la capacidad de diferenciación de células MSC de médula ósea [211]. Sin embargo, los resultados mostrados demuestran con claridad que es posible diferenciar a osteocitos células UCSSC cultivadas en condiciones de hipoxia sobre telas de carbón activado [160], también se ha demostrado que las células UCSSC mantienen su potencial para diferenciarse a otros tipos celulares del linaje mesenquimal siendo capaces de progresar hacia la adipogénesis, la osteogénesis o la condrogénesis. En nuestro caso parece que, la diferenciación

adipogénica de células UCSSC da origen a adipocitos atípicos con inclusiones multiloculadas que se tiñen específicamente con *Oil red-O*.

El potencial de diferenciación, la negatividad para moléculas de superficie como el *CD34*, el *PTPRC* y el *CD14* y la alta positividad para moléculas como el *THY1* y el *ENG* satisfacen los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para considerar las células extraídas del estroma del cordón umbilical (UCSSC) como líneas celulares con características de MSC [112].

5.1.3 Las células UCSSC se relacionan ultraestructuralmente y funcionalmente con miofibroblastos

De las seis isoformas de actina descritas en mamíferos, la *ACTA2* está comúnmente expresada en células de músculo liso [215] y en miofibroblastos [216], en los cuales el nivel de expresión está relacionado con su grado de diferenciación [217]. Los miofibroblastos son cruciales en la remodelación de los tejidos contribuyendo a la síntesis y organización de la matriz extracelular y a la producción de las fuerzas contráctiles [217]. Las proteínas de la matriz extracelular del estroma del cordón umbilical son probablemente producidas por las células estromales del cordón [123], que también dan origen a las UCSSC que se han conseguido aislar y mantener en cultivo a lo largo de los diferentes ensayos realizados. La expresión de *ACTA2* se mantiene constante en más del 90% de las células UCSSC hasta el pase 5 y luego empieza a decrecer con el aumento del número de los subcultivos. Esto explica los resultados aparentemente contradictorios a pases 3 – 5 en la Figura 4.11H (92, 69% \pm 2, 33%) y a pase 9 en la Figura 4.10B (33, 0% \pm 6, 6%).

Se ha ensayado la capacidad contráctil de las UCSSC a pase 3 usando *TGF β 1* y PDGF, dos citoquinas capaces de inducir contractilidad en miofibroblastos [218]. Ambas citoquinas indujeron la contracción celular en células UCSSC de forma proporcional a la dosis, tal y como se ha observado previamente en miofibroblastos [219]. Por otro lado, el tratamiento con *IL10* llevó a un aumento del volumen de la matriz de colágeno debido a la relajación de las células. Tras 48 horas de estimulación con citoquinas, las células embebidas en la matriz se mantuvieron en cultivo durante 24 horas adicionales sin estimulación de citoquinas para ensayar la reversibilidad del efecto. Los resultados demuestran la reversibilidad en el caso de la contracción observada en las células estimuladas con PDGF y *TGF β 1* y también en el proceso de relajación observada en células estimuladas con *IL10*, lo que confirma la naturaleza fisiológica del mecanismo.

De esta manera, podemos decir que las UCSSC son contráctiles y por ello están relacionadas funcionalmente con los miofibroblastos. Además, sus características ultraestructurales recuerdan también a los miofibroblastos, presentando retículo endoplasmático rugoso bien desarrollado, miofilamentos citoplasmáticos, material similar al de la membrana basal y uniones gap. Estas características observadas en las células UCSSC en cultivo son similares a las observadas en los miofibroblastos de la gelatina de Wharton estudiados por Takechi y col. [122]. Por lo tanto, las células UCSSC podrían tener dentro del estroma del cordón umbilical una función específica de miofibroblastos diferenciados. Dicha función, probablemente contribuye para la regulación del flujo sanguíneo a lo largo del cordón umbilical, equilibrando la presión en su interior en relación con la del ambiente, dentro de la cavidad uterina. Además cuando se las separa del estroma y se las cultiva

generan células compatibles con las denominadas genéricamente células MSC.

5.2 Modelo para el desarrollo inicial de aplicaciones clínicas

La radioterapia clínica del cáncer inevitablemente lleva a que el cuerpo entero del paciente quede expuesto a las señales de vecindad que son inducidas por la radiación. El objetivo principal de la terapia es destruir células tumorales, pero la terapia anti-cáncer podría tener un efecto adicional que puede resultar decisivo: la respuesta de las células con daños sub-letales podría ser necesaria para el éxito de la terapia [220] porque la comunicación de estas células, con las células tumorales que no hayan sido dañadas por la radiación, puede reducir la supervivencia global de los clonógenos tumorales. En los últimos años se han realizado muchos estudios sobre los efectos de vecindad de la radiación y las evidencias muestran que tal y como los efectos causados por el daño directo al ADN, las células irradiadas también envían señales a las células vecinas, causando una variedad de posibles efectos a las células no-irradiadas, que se conocen, de manera general, bajo la denominación de efecto de vecindad. La importancia de estos efectos parece ser mayor a bajas o moderadas dosis de radiación siendo de difícil identificación cuando el efecto de vecindad se estudia a dosis elevadas [190, 191].

5.2.1 Daño al ADN y la supervivencia celular tras la radiación

Utilizando el ensayo cometa hemos encontrado que, en comparación con las células UCSSC, las células de melanoma tienen una tasa de reparación de las rotu-

ras de cadenas de ADN que es más rápida, y que se inicia con gran rapidez después de la exposición de las células a 6 Gy de radiación γ (≤ 4 horas). Las células de melanoma muestran también mayor capacidad de reagrupamiento de las rupturas dobles de cadena del ADN que las células UCSSC, cuando se estudia el daño residual tras 24 horas de cultivo (Figuras 4.20A y B). Estas diferencias se corresponden con los resultados encontrados para los ensayos de supervivencia clonogénica (Figura 4.19) porque en las células UCSSC que son más sensibles a la radiación directa muestran un valor de D_0 (la dosis que reduce la fracción de células supervivientes al 37 %) comprendido entre 1,25 e 1,68 Gy, lo que se corresponde con una cinética de reparación de ADN más lenta (el 67, $20 \pm 9,4\%$ y 50, $65 \pm 9,97\%$). Además, las roturas dobles de cadena de ADN iniciales inducidas por la radiación permanecieron sin repararse a las 4 horas después de la irradiación, mientras que en las células tumorales de melanoma el D_0 estuvo comprendido entre 3,05 y 3,62 Gy y la cantidad de roturas de cadenas dobles que permanecieron sin repararse tras 4 horas de incubación fue de sólo $10,6 \pm 2,6$ y $40,32 \pm 6,9\%$ en cada línea de célula tumoral de melanoma estudiada. Estos resultados son consistentes con estudios previos [173] y además sabemos que las células madre representan un modelo caracterizado por su alta radio-sensibilidad frente a la radiación ionizante directa [221].

5.2.2 Supervivencia clonogénica en células de la vecindad

Nuestros resultados (Figura 4.21A) soportan la hipótesis de que los efectos de vecindad promovidos por la radiación en el seno de los tumores o tejidos irradiados pueden ser un fenómeno que ocurra de manera frecuente [190] y que tiene

lugar cuando las células tumorales entran en contacto con medio de cultivo en el que el mismo tipo celular ha sido irradiado. Sin embargo, las células madre de los tejidos normales, en este estudio representadas por las células UCSSC, aunque extremadamente radiosensibles a la radiación, son resistentes a los efectos de vecindad inducidos con el medio MC generado tras la irradiación de células A375 y G361 a dosis de 0 a 8 Gy (Figura 4.21B). Otros estudios describieron la ausencia de cualquier efecto de vecindad en fibroblastos humanos [222], células madre embrionarias (ESC) [223] y MSC [224]. Las células mesenquimales son también resistentes a las acciones que provocan los ligandos de muerte celular cuando estas células se transducen con un vector retroviral que codifica la molécula de TRAIL humana [225]. Sin embargo, la respuesta a las acciones de vecindad, es fácil de observar cuando se estudian líneas celulares tumorales establecidas [225-228]. Para avanzar en la interpretación científica de los datos de dependencia del efecto de vecindad en función de la dosis, hemos aplicado un modelo biofísico que se utiliza para describir como células, receptores o proteínas se unen a ligandos y tras la formación del complejo receptor-ligando originan el producto específico de la reacción. En el caso del efecto de vecindad, en este trabajo se ha estudiado como producto de la reacción la muerte celular como conclusión del proceso catalítico iniciado por la unión del ligando con el receptor en la superficie celular. Aunque los resultados obtenidos puede que no sean considerados como la prueba definitiva de los mecanismos involucrados en el efecto de vecindad podemos, seguramente, decir que los valores experimentales se ajustan muy bien ($P < 0,0001$) al modelo matemático. Hemos observado la saturación del efecto de vecindad en ambas líneas A375 y G361, con valores estadísticamente diferentes para χ_{max} y K_{By} (Tabla 4.2) cuando ambas curvas de dosis-respuesta (Figura 4.21A) se comparan.

5.2.3 Modalidad de muerte celular

Uno de los mayores problemas en la terapia del cáncer es la existencia en los tumores de células resistentes al tratamiento. El efecto de vecindad puede tener una implicación de importancia sobre el resultado de la radioterapia del cáncer al actuar como un mecanismo adicional capaz de propagar la muerte de las células tumorales desde las que han sido subletalmente alcanzadas por la radiación a las que han quedado indemnes a la acción de la misma. Los resultados de los experimentos realizados en este trabajo utilizando las líneas tumorales A375 y G361 y los experimentos de citometría de flujo para medir la fragmentación del ADN (la fracción de células en la región sub-G1 del histograma) muestran que en células tumorales de melanoma tras el tratamiento con medio MC, el porcentaje de células apoptóticas se relaciona con la magnitud de la dosis administrada para generar el medio MC (Figura 4.22). Estos resultados sugieren que, por lo menos, para las dosis comprendidas entre 0,25 y 4 Gy, el factor citotóxico soluble liberado al medio de cultivo y capaz de activar la muerte por apoptosis, está proporcionalmente relacionado con la dosis.

5.2.4 Fraccionamiento del tratamiento y respuesta de vecindad

La mayoría de los tratamientos de radioterapia incluyen el fraccionamiento de la dosis [193, 229]. Las dosis de radiación que se administran y los resultados que, en términos de probabilidades de curación o complicaciones asociadas, deben esperarse están precisamente cuantificados mediante modelos matemáticos. En este contexto la existencia del efecto de vecindad, y las aplicaciones terapéuticas que incluyen la administración de la dosis utilizando múltiples campos, son factores que

deben ser incluidos en los modelos de predicción de resultados terapéuticos con el objetivo de, mejorando la modelización, poder comprender más precisamente la biología de la respuesta tumoral a la radiación. Los resultados obtenidos (Figura 4.21C) sugieren que el efecto acumulativo de la exposición a 4 ciclos de tratamiento con un medio de cultivo de células expuestas a 6 Gy puede ser descrito como una situación no-interactiva en la que cada fracción de tratamiento con medio MC sobre células no-irradiadas causa el mismo efecto individual. Si este resultado se debe a que las células sometidas a tratamiento responden a cada señal fresca sin que ningún proceso de adaptación ni “recuperación” entre señales intervenga es un aspecto biológico del problema que aún queda por resolver. Lo que queda claro es que la reiteración de tratamientos con medio MC es una estrategia con la que se puede superar el límite de saturación del efecto de vecindad observada en células que han recibido un único tratamiento con medio MC producido tras la irradiación de las células a dosis comprendidas dentro de un amplio rango (Figura 4.21A). Esta saturación significa que cualquiera que sea la dosis aplicada para obtener el medio MC no todas las células que se someten a la acción de esos medios MC responden con un efecto de vecindad que lleve a la muerte de la célula sensible. Trabajos previos indican que las células en fase S deben ser más vulnerables a los efectos de vecindad [230]. Estos resultados, juntos con: (i) el efecto bien conocido de la hipersensibilidad celular a dosis menores que 1 Gy, típicamente alrededor de 0,5 Gy [231-234]; (ii) nuestro descubrimiento de que los valores de K_{By} para la muerte celular inducida por el efecto de vecindad están alrededor de 0,2 a 0,3 Gy; (iii) los datos recientemente publicados de que una de las moléculas que juegan un papel en la muerte celular es TRAIL [235]; y (iv) el hecho de que TRAIL tiene una vida media corta en el plasma [236], nos llevan a sugerir un cambio en el progra-

ma de fraccionamiento de la dosis [193] en un intento de unir hipersensibilidad, máxima concentración extracelular del ligando del receptor de muerte, así como el incremento de la regulación de los receptores de muerte en células tumorales promovida por la radiación y, evidentemente, también la redistribución celular que ocurre en el tumor tras la radioterapia.

5.2.5 ¿Cuál puede ser la naturaleza del factor presente en el medio MC?

El efecto de vecindad es una manifestación de las señales inducidas por la radiación que viajan desde las células irradiadas a sus vecinas y que resultan estar mediadas por moléculas que se expresan constitutivamente o que pueden ser inducidas en células-diana [183, 237-239]; estas señales que deben ser específicas aun cuando pueden ser no-específicas en sus mecanismos de acción, y en este contexto las especies de oxígeno reactivo difusibles y determinados factores proteicos secretados por las células sometidas a irradiación han sido identificados como posibles mediadores en el efecto de vecindad [185]. Mediante los experimentos con medio MC diluido se ha demostrado la existencia de un efecto dosis-respuesta (Figura 4.21C). Además, muchos estudios recientes han revelado que uno o muchos de los factores secretados por células irradiadas, como *TGFB1*, interleucina 8 (*IL8*), factor de necrosis tumoral (*TNF*) y factor 10 de la superfamilia de factores relacionados con el factor de necrosis tumoral (*TNFSF10*), más conocido como TRAIL (*TRAIL*) son proteínas que pueden estar involucradas en la propagación del efecto de vecindad [234, 235, 240-243]. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una muerte celular consistente causada por el medio MC en ambos modelos tumorales

(A375 y G361) (Figura 4.21A). Estos resultados sugieren que determinadas citoquinas pueden ser secretadas por las células irradiadas y que éstas pueden ser los efectores de la muerte celular observada aquí. Además, los datos obtenidos (Figura 4.22B) confirman resultados publicados recientemente que revelan que las células UCSSC son insensibles al medio MC de la misma forma que lo son las células MSC de médula ósea, de tejido adiposo y de cordón umbilical [235]. Por lo tanto, es posible confirmar que la señalización inducida por el efecto de vecindad en células que no resultaron afectadas por la acción directa de la radiación difiere en muchos aspectos claves de la respuesta celular a la radiación directa sea cual sea la lesión que origina los efectos de vecindad. Adicionalmente, parece claro que, por la existencia de efectos de vecindad, los efectos de la radiación van más allá de la esperada reducción del número de células viables. En contraste a las células de melanoma, las células MSC son insensibles a los ligandos señalizadores *Fas* (*TNF receptor superfamily, member 6*) (*FAS*), *TRAIL* y *TNF* producidos por las células tumorales activadas por la radiación. Los resultados obtenidos corroboran la hipótesis de que la terapia celular con células UCSSC combinadas con la radioterapia podría ser de gran interés porque estas células son capaces de albergarse en los tumores primarios y en depósitos tumorales microscópicos [244, 245] y liberar *TRAIL* como respuesta al tratamiento radiológico. El modelo lineal-cuadrático (LQ) y su interpretación mecanicista describe adecuadamente la respuesta celular a la radiación para dosis superiores a 2 Gy. A dosis más bajas de 2 Gy el modelo LQ subestima substancialmente el efecto de la radiación. Aunque esto se observó por primera vez en el año 1993 [202] los mecanismos moleculares involucrados en el modelo de hipersensibilidad a bajas dosis [246] y en el efecto de vecindad no se han identificado todavía.

5.2.6 Modelo de daño al ADN y modelo non-targeted tras la radiación

Describimos aquí un modelo empírico de la respuesta a la irradiación celular que incorpora los efectos directos y los efectos de vecindad. El modelo se basa en un marco matemático que ha sido recientemente propuesto con el fin de separar los componentes directo y de vecindad de las curvas dosis-respuesta de supervivencia a la radiación ionizante [247]. Las evidencias demuestran que, como además de efectos dependientes del daño directo al ADN, las células irradiadas también mandan señales a sus vecinas; aquí consideramos que la supervivencia clonogénica (S) tras el tratamiento con radiación depende tanto de los efectos de la interacción de radiación pura (Z_R) como de la interacción de vecindad (Z_{By}). Asumiendo que los efectos directos de la radiación y los efectos de vecindad sobre la supervivencia celular son independientes, la respuesta total podría expresarse como:

$$S = Z_R \times Z_{By} \quad (5.1)$$

Los resultados experimentales obtenidos permiten calcular los valores de S de acuerdo con la fracción de células supervivientes tras cada dosis (desde 0 a 8 Gy) en los experimentos de supervivencia clonogénica Z_R , (Figuras 5.1A y B, líneas rojas), y los valores de Z_{By} a partir de los resultados experimentales de transferencia de medio (Figuras 5.1A y B, líneas negras) para el mismo rango de dosis. Los resultados de estos cálculos (S) se muestran en las Figuras 5.1A y B (líneas azules). Las curvas dibujadas permiten confirmar que la forma de los valores teóricos de (S) producidos por nuestro abordaje, combinando los componentes directos con los componentes de vecindad de la respuesta celular a la radiación se ajustan con los experimentos demostrativos de la hipersensibilidad a bajas dosis. Además, pa-

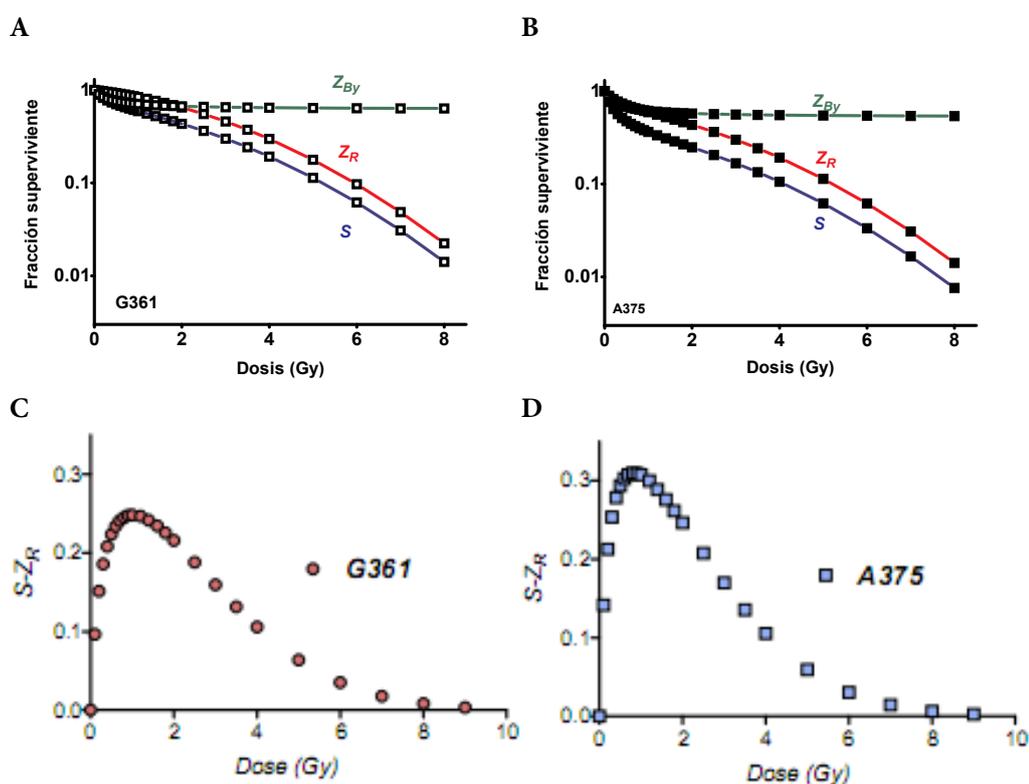


Figura 5.1: Modelo de daño al ADN y modelo no-diana tras radioterapia. (A)–(B) Fracción superviviente descrita por la interacción pura de la irradiación (modelo lineal-cuadrático: Z_R); como resultado de los experimentos con medio MC (modelo de vecindad: Z_{By}) y como resultado de la combinación de ambos efectos (modelo integrado: S). (C)–(D) Diferencias entre valores teóricos para S y valores experimentales para Z_R .

ra valores de dosis comprendidos entre 2 y 8 Gy las diferencias entre las curvas de S y Z_R son aparentemente constantes y paralelas, mientras que en el rango de 0 a 2 Gy estas diferencias aumentan ligeramente a principio para alcanzar un valor máximo alrededor de 1 Gy y después decrecer hasta adoptar una pendiente constante en la segunda parte de la curva S (Figuras 5.1A y B).

De todas formas, se puede llegar a una estimación teórica al conjunto del efecto de la radiación midiendo los valores para Z_R y Z_{By} y calcular la probabilidad de supervivencia compuesta, S . La expresión matemática para nuestro modelo final

es

$$S = e^{\alpha D + \beta D^2} \cdot \left(1 - \chi_{max} \cdot \frac{D}{K_{By} + D} \right) \quad (5.2)$$

Esto significa que la probabilidad de la supervivencia celular clonogénica depende de ambos efectos: los efectos directos de la radiación (modelo lineal-cuadrático) y los efectos de vecindad, pudiendo estos últimos ser también fenómenos compuestos de efectos de vecindad de largo y corto recorridos, cuya importancia relativa puede, por lo menos *in vitro*, ser estimada. Los valores finales de S indican que los efectos letales de la radiación en células tumorales puede ser significativamente incrementados por interacciones inesperadas entre células irradiadas y células vecinas no-irradiadas.

Finalmente, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la muerte de las células vecinas podría ajustarse a un modelo en el cual la muerte parece ser el resultado de la expresión de receptores de muerte funcionales en las células no-irradiadas y la secreción desde las células irradiadas de formas solubles de ligandos para los receptores de muerte. El papel de los receptores de muerte y sus ligandos en la muerte celular por apoptosis es, por otro lado, bien conocido. Los ligandos de *TRAIL* y sus receptores han estado involucrados en el efecto de vecindad y ambos, receptores y ligandos, podrían verse incrementados tras la administración de una dosis de radiación de baja a moderada magnitud a las células tumorales [234, 240, 243]. La componente del efecto de vecindad de la muerte celular cuantificada en este trabajo subraya la necesidad de confirmar nuestras observaciones en una situación clínica. Además las células UCSSC utilizadas aquí han demostrado ser resistentes al efecto de vecindad y podrían, por lo tanto, ser utilizadas como una herramienta para la administración de *TRAIL* a los tumores, siguiendo así las su-

gerencias realizadas recientemente por otros investigadores. La hipersensibilidad a bajas dosis junto al efecto de vecindad observado a la misma dosis nos inducen a pensar que ambos fenómenos pueden ser explotados clínicamente si fuera practicable administrar radioterapia a dosis menores que 1,6 Gy por fracción, dos veces al día, con período de separación comprendido entre 8 y 12 horas, para así decidir la dosis total a administrar y el fraccionamiento a realizar y comparar este programa terapéutico con el definido convencionalmente. El objetivo sería aprovechar la radiosensibilidad extra en la región de más alta sensibilidad a la radiación HRS, la muerte celular adicional proveniente del efecto de vecindad y la adaptación del tratamiento de fraccionamiento de la dosis a la vida media de las citoquinas liberadas en el espacio vascular.

5.2.7 Poblaciones celulares tumorales tras radioterapia

La Figura 5.2 muestra un resumen esquemático de nuestro modelo para la acción biológica de una dosis típica de radiación (≈ 2 Gy/día) utilizada en los esquemas de radioterapia. Los médicos que administran radioterapia o quimioterapia lo hacen con la seguridad de que el objetivo principal de la radioterapia es destruir células tumorales. El paradigma de que los efectos de la radioterapia se restringen a los efectos directos o indirectos del daño al ADN causado por la radiación se ha cuestionado en estudios recientes, los cuales indican que los efectos letales de la radiación en células tumorales se puede ver incrementados por interacciones inesperadas entre células irradiadas y no-irradiadas situadas en la vecindad [165, 166, 241-245].

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han llevado a resumir nuestras

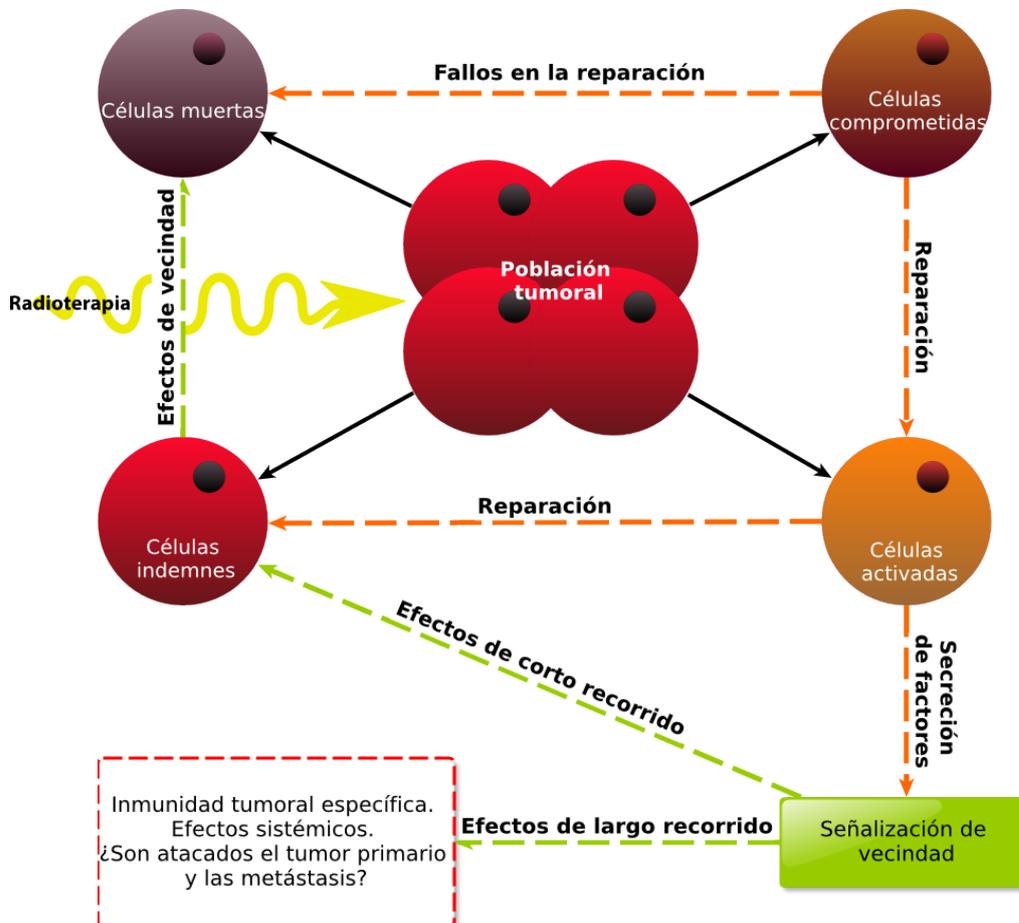


Figura 5.2: Modelo para la acción biológica de una dosis típica de radiación.

hipótesis sobre la acción biológica de una dosis típica de radiación ionizante (≈ 2 Gy/día), tal como la que es habitualmente usada en radioterapia en la forma que se esquematiza en la figura 5.2:

Y postulamos que, tras la administración de cada fracción de la dosis a un tumor, la población de células que dicho tumor contiene se puede separar en cuatro compartimentos:

- A. Células **muertas** que como consecuencia de la radioterapia han sufrido lesiones irreparables.
- B. Células **comprometidas** que son las células afectadas por lesiones potencialmente letales cuyo destino eventual dependerá de los procesos de reparación y reparación equivocada. Las flechas del diagrama indican el flujo de células desde este compartimento a los compartimentos C o A.
- C. Células **activadas** que son las que han sufrido daños mínimos o que, tras reparación, conservan un nivel de daño residual compatible con su supervivencia celular. Estas células pueden convertirse en una fuente de citoquinas, radicales libres que contienen oxígeno (ROS) y especies reactivas que contienen nitrógeno reactivo cuyas acciones tóxicas, por vecindad y quizás a través de las vías sistémicas, pueden afectar a la población de células tumorales reduciendo su supervivencia.
- D. Células **indemnes** que son las células que sobreviven a la acción de cada fracción de la dosis de radiación y que, para ser controladas, necesitan de tratamientos de irradiación sucesivos.

La población celular, C, está involucrada en los efectos de vecindad de corto y largo alcance, que ocurren en la vecindad del tumor o a distancia del mismo. Podemos imaginar que sólo las células que sobreviven tras la interacción, producen señales de muerte y que su transmisión, por comunicación intercelular directa a través de las “*gap junctions*”, o a través de las vías vasculares y linfáticas, producirán los efectos de vecindad (*bystander*) y sistémicos (abscopales) de la radioterapia.

En ambos casos el efecto biológico que, indirectamente, parece inducir la radioterapia nos obliga a replantear el modelo biofísico basado en la ecuación lineal-cuadrática que es de uso general en las aplicaciones clínicas de la radiación con fines terapéuticos.

Aunque las estrategias terapéuticas capaces de modular las rutas de señalización de los receptores de muerte combinadas con agentes anti-neoplásticos pueden en la actualidad ser de interés exclusivamente académico, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que las células tumorales activadas producen efectos tóxicos mensurables sobre células tumorales no irradiadas, que son mediados por formas solubles de ligandos de muerte secretados por las células dañadas al medio de cultivo y que como factores difusibles, amplifican la respuesta celular a la irradiación a través de un mecanismo de vecindad dosis dependiente. Se ha determinado que el efecto de vecindad que provoca la muerte de las células no-irradiadas podría ser debido a la expresión de receptores de muerte funcionales en las células tumorales y a la secreción de formas solubles de esos ligandos de los receptores de muerte. Ambos, receptores y ligandos podrían incrementarse a través de la administración de dosis moderadas o bajas de radiación al tumor. Además, las células UCSSC utilizadas aquí han demostrado ser resistentes a los efectos de vecindad y puede que sean adecuadas como herramientas para administrar TRAIL a los tumores.

Ahora, parece más claro que los efectos de la radiación superan la esperada reducción en el número de células tumorales viables a través de los efectos de vecindad (Figura 5.2). En contraste con las células de melanoma, las células madre mesenquimales no se ven afectadas por la señalización de los ligandos de Fas, TRAIL e TNF producidas por las células tumorales activadas.

Conclusiones

1. Las células UCSSC en cultivo se relacionan ultraestructuralmente y funcionalmente con miofibroblastos; tienen un fenotipo muy similar a las células UCSSC “*in situ*” y provienen de la gelatina de Wharton que circunda los vasos del cordón umbilical.
2. Las células UCSSC cultivadas en condiciones hipóxicas, con baja concentración de suero y en presencia de PDGF y EGF, experimentan un incremento en el potencial de crecimiento que ocasiona la reducción de los valores de su tiempo de duplicación, sin perjuicio de su estabilidad cariotípica.
3. El fenotipo que presentan las células UCSSC satisface los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para que estas células sean consideradas como líneas de células madre mesenquimales.
4. Las células UCSSC cultivadas sobre telas de carbón activado siguen proliferando y son capaces de diferenciarse hacia osteocitos y condrocitos.

5. Las células UCSSC son extremadamente radiosensibles, pero resistentes a los efectos de vecindad inducidos por el medio condicionado generado tras la irradiación de células tumorales.

Referencias

- [1] D. A. Melton y C. Cowen. ““Stemness”: Definitions, Criteria, and Standards”. En: *Essentials of Stem Cell Biology*. Ed. por R. Lanza, J. Gearhart, B. Hogan, D. Melton, R. Pedersen, E. D. Thomas, J. Thomson y S. I. Wilmot. Second. San Diego: Academic Press, 2009, págs. xxiii-xxix. DOI: 10.1016/B978-0-12-374729-7.00083-4.
- [2] H. Mikkers y J. Frisén. “Deconstructing stemness.” En: *EMBO Journal* 24.15 (ago. de 2005), págs. 2715-2719. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600749.
- [3] Y. M. Yamashita, H. Yuan, J. Cheng y A. J. Hunt. “Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis.” En: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.1 (ene. de 2010), a001313. DOI: 10.1101/cshperspect.a001313.
- [4] A. D. Ho y W. Wagner. “The beauty of asymmetry: asymmetric divisions and self-renewal in the haematopoietic system.” En: *Curr Opin Hematol* 14.4 (jul. de 2007), págs. 330-336. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3281900f12.
- [5] E. Fuchs, T. Tumber y G. Guasch. “Socializing with the neighbors: stem cells and their niche.” En: *Cell* 116.6 (mar. de 2004), págs. 769-778.
- [6] C. E. Burns y L. I. Zon. “Portrait of a stem cell.” En: *Developmental Cell* 3.5 (nov. de 2002), págs. 612-613.
- [7] K. W. Orford y D. T. Scadden. “Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation.” En: *Nature Reviews Genetics* 9.2 (feb. de 2008), págs. 115-128. DOI: 10.1038/nrg2269.
- [8] Y.-H. Loh, L. Yang, J. C. Yang, H. Li, J. J. Collins y G. Q. Daley. “Genomic Approaches to Deconstruct Pluripotency.” En: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 12 (sep. de 2011), págs. 165-85. DOI: 10.1146/annurev-genom-082410-101506.
- [9] B. Bhattacharya, S. Puri y R. K. Puri. “A review of gene expression profiling of human embryonic stem cell lines and their differentiated progeny.” En: *Curr Stem Cell Res Ther* 4.2 (mayo de 2009), págs. 98-106.
- [10] M. Ramalho-Santos, S. Yoon, Y. Matsuzaki, R. C. Mulligan y D. A. Melton. ““Stemness”: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells.” En: *Science* 298.5593 (oct. de 2002), págs. 597-600. DOI: 10.1126/science.1072530.
- [11] T. S. Tanaka, T. Kunath, W. L. Kimber, S. A. Jaradat, C. A. Stagg, M. Usuda, T. Yokota, H. Niwa, J. Rossant y M. S. H. Ko. “Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity.” En: *Genome Research* 12.12 (dic. de 2002), págs. 1921-1928. DOI: 10.1101/gr.670002.
- [12] S. V. Anisimov, K. V. Tarasov, D. Tweedie, M. D. Stern, A. M. Wobus y K. R. Boheler. “SAGE identification of gene transcripts with profiles unique to pluripotent mouse R1 embryonic stem cells.” En: *Genomics* 79.2 (feb. de 2002), págs. 169-176. DOI: 10.1006/geno.2002.6687.

- [13] K. Park, Y. He, F. Lin, O. D. Laerum, Q. Tian, R. Bumgarner, C. A. Klug, K. Li, C. Kuhr, M. J. Doyle, T. Xie, M. Schummer, Y. Sun, A. Goldsmith, M. F. Clarke, I. L. Weissman, L. Hood y L. Li. "Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells." En: *Blood* 99.2 (ene. de 2002), págs. 488-498. doi: 10.1182/blood.V99.2.488.
- [14] N. B. Ivanova, J. T. Dimos, C. Schaniel, J. A. Hackney, K. A. Moore e I. R. Lemischka. "A stem cell molecular signature." En: *Science* 298.5593 (oct. de 2002), págs. 601-604. doi: 10.1126/science.1073823.
- [15] M. Koeva, E. C. Forsberg y J. M. Stuart. "Computational integration of homolog and pathway gene module expression reveals general stemness signatures." En: *PLoS One* 6.4 (2011), e18968. doi: 10.1371/journal.pone.0018968.
- [16] J. A. Knoblich. "Mechanisms of asymmetric stem cell division." En: *Cell* 132.4 (feb. de 2008), págs. 583-597. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.007.
- [17] J. Rehman. "Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells." En: *J Mol Med* 88.10 (oct. de 2010), págs. 981-986. doi: 10.1007/s00109-010-0678-2.
- [18] R. G. Edwards y H. K. Beard. "Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos." En: *Mol Hum Reprod* 3.10 (oct. de 1997), págs. 863-905. doi: 10.1093/molehr/3.10.863.
- [19] C. A. Ziomek, M. H. Johnson y A. H. Handyside. "The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres." En: *J Exp Zool* 221.3 (jul. de 1982), págs. 345-355. doi: 10.1002/jez.1402210310.
- [20] A. Suwińska, R. Czołowska, W. Ozdzeński y A. K. Tarkowski. "Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos." En: *Dev Biol* 322.1 (oct. de 2008), págs. 133-144. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.07.019.
- [21] D. A. Melton y C. Cowan. "Stemness". En: *Handbook of Stem Cells*. Ed. por R. Lanza, J. Gearhart, B. Hogan, D. Melton, R. Pedersen, J. Thomson y M. West. Burlington: Academic Press, 2004, págs. xxv -xxxi. doi: 10.1016/B978-012436643-5/50004-3.
- [22] R. Friel, S. van der Sar y P. J. Mee. "Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling." En: *Adv Drug Deliv Rev* 57.13 (dic. de 2005), págs. 1894-1903. doi: 10.1016/j.addr.2005.08.002.
- [23] M. J. Evans y M. H. Kaufman. "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." En: *Nature* 292.5819 (jul. de 1981), págs. 154-156. doi: 10.1038/292154a0.
- [24] G. R. Martin. "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78.12 (dic. de 1981), págs. 7634-7638.
- [25] C. Leeb, M. Jurga, C. McGuckin, N. Forraz, C. Thallinger, R. Moriggl y L. Kenner. "New perspectives in stem cell research: beyond embryonic stem cells." En: *Cell Prolif* 44 Suppl 1 (abr. de 2011), págs. 9-14. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00725.x.
- [26] N. D. Girolamo. "Stem cells of the human cornea." En: *Br Med Bull* (jun. de 2011), págs. 1-17. doi: 10.1093/bmb/ldr026.
- [27] S. Rafii, F. Shapiro, J. Rimarachin, R. L. Nachman, B. Ferris, B. Weksler, M. A. Moore y A. S. Asch. "Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion." En: *Blood* 84.1 (jul. de 1994), págs. 10-19.
- [28] J. Nichols, B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler y A. Smith. "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." En: *Cell* 95.3 (oct. de 1998), págs. 379-391. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81769-9.

- [29] B. Bhattacharya, T. Miura, R. Brandenberger, J. Mejido, Y. Luo, A. X. Yang, B. H. Joshi, I. Ginis, R. S. Thies, M. Amit, I. Lyons, B. G. Condie, J. Itskovitz-Eldor, M. S. Rao y R. K. Puri. "Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature." En: *Blood* 103.8 (abr. de 2004), págs. 2956-2964. doi: 10.1182/blood-2003-09-3314.
- [30] L. Hyslop, M. Stojkovic, L. Armstrong, T. Walter, P. Stojkovic, S. Przyborski, M. Herbert, A. Murdoch, T. Strachan y M. Lako. "Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages." En: *Stem Cells* 23.8 (sep. de 2005), págs. 1035-1043. doi: 10.1634/stemcells.2005-0080.
- [31] R. G. Edwards. "IVF and the history of stem cells." En: *Nature* 413.6854 (sep. de 2001), págs. 349-351. doi: 10.1038/35096649.
- [32] J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall y J. M. Jones. "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." En: *Science* 282.5391 (nov. de 1998), págs. 1145-1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- [33] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda y S. Yamanaka. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." En: *Cell* 131.5 (nov. de 2007), págs. 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [34] M. Wernig, A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B. E. Bernstein y R. Jaenisch. "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." En: *Nature* 448.7151 (jul. de 2007), págs. 318-324. doi: 10.1038/nature05944.
- [35] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin y J. A. Thomson. "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." En: *Science* 318.5858 (dic. de 2007), págs. 1917-1920. doi: 10.1126/science.1151526.
- [36] M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochizuki, N. Takizawa y S. Yamanaka. "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." En: *Nature Biotechnology* 26.1 (ene. de 2008), págs. 101-106. doi: 10.1038/nbt1374.
- [37] H. Park, R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch y G. Q. Daley. "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors." En: *Nature* 451.7175 (ene. de 2008), págs. 141-146. doi: 10.1038/nature06534.
- [38] A. A. Avilion, S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian y R. Lovell-Badge. "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." En: *Genes & Development* 17.1 (ene. de 2003), págs. 126-140. doi: 10.1101/gad.224503.
- [39] K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda y S. Yamanaka. "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." En: *Cell* 113.5 (mayo de 2003), págs. 631-642. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00393-3.
- [40] I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie y A. Smith. "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." En: *Cell* 113.5 (mayo de 2003), págs. 643-655. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00392-1.
- [41] A. Sémont, S. François, M. Mouiseddine, A. François, A. Saché, J. Frick, D. Thierry y A. Chapel. "Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury." En: *Adv Exp Med Biol* 585 (2006), págs. 19-30.
- [42] S. Wolbank, A. Peterbauer, M. Fahrner, S. Hennerbichler, M. van Griensven, G. Stadler, H. Redl y C. Gabriel. "Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue." En: *Tissue engineering* 13.6 (jun. de 2007), págs. 1173-83. doi: 10.1089/ten.2006.0313.

- [43] S. Ilancheran, A. Michalska, G. Peh, E. M. Wallace, M. Pera y U. Manuelpillai. "Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential." En: *Biology of Reproduction* 77.3 (sep. de 2007), págs. 577-588. doi: 10.1095/biolreprod.106.055244.
- [44] F. Alviano, V. Fossati, C. Marchionni, M. Arpinati, L. Bonsi, M. Franchina, G. Lanzoni, S. Cantoni, C. Cavallini, F. Bianchi, P. L. Tazzari, G. Pasquinelli, L. Foroni, C. Ventura, A. Grossi y G. P. Bagnara. "Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro." En: *BMC Dev Biol* 7 (2007), pág. 11. doi: 10.1186/1471-213X-7-11.
- [45] M. Soncini, E. Vertua, L. Gibelli, F. Zorzi, M. Denegri, A. Albertini, G. S. Wengler y O. Parolini. "Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes." En: *J Tissue Eng Regen Med* 1.4 (2007), págs. 296-305. doi: 10.1002/term.40.
- [46] N. Sakuragawa, K. Kakinuma, A. Kikuchi, H. Okano, S. Uchida, I. Kamo, M. Kobayashi e Y. Yokoyama. "Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells." En: *Journal of Neuroscience Research* 78.2 (oct. de 2004), págs. 208-214. doi: 10.1002/jnr.20257.
- [47] C. Ventura, S. Cantoni, F. Bianchi, V. Lionetti, C. Cavallini, I. Scarlata, L. Foroni, M. Maioli, L. Bonsi, F. Alviano, V. Fossati, G. P. Bagnara, G. Pasquinelli, F. A. Recchia y A. Perbellini. "Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts." En: *Journal of Biological Chemistry* 282.19 (mayo de 2007), págs. 14243-14252. doi: 10.1074/jbc.M609350200.
- [48] P. Zhao, H. Ise, M. Hongo, M. Ota, I. Konishi y T. Nikaido. "Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes." En: *Transplantation* 79.5 (mar. de 2005), págs. 528-535.
- [49] T. Miki, T. Lehmann, H. Cai, D. B. Stolz y S. C. Strom. "Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells." En: *Stem Cells* 23.10 (2005), págs. 1549-1559. doi: 10.1634/stemcells.2004-0357.
- [50] F. Marongiu, R. Gramignoli, K. Dorko, T. Miki, A. R. Ranade, M. Paola Serra, S. Doratiotto, M. Sini, S. Sharma, K. Mitamura, T. L. Sellaro, V. Tahan, K. J. Skvorak, E. C. S. Ellis, S. F. Badylak, J. C. Davila, R. Hines, E. Laconi y S. C. Strom. "Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells." En: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53.5 (mayo de 2011), págs. 1719-29. doi: 10.1002/hep.24255.
- [51] S. Takashima, H. Ise, P. Zhao, T. Akaike y T. Nikaido. "Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions." En: *Cell Struct Funct* 29.3 (jun. de 2004), págs. 73-84. doi: 10.1247/csf.29.73.
- [52] K. Kakishita, N. Nakao, N. Sakuragawa y T. Itakura. "Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions." En: *Brain Research* 980.1 (ago. de 2003), págs. 48-56. doi: 10.1016/S0006-8993(03)02875-0.
- [53] C. B. Portmann-Lanz, A. Schoeberlein, A. Huber, R. Sager, A. Malek, W. Holzgreve y D. V. Surbek. "Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration." En: *Am J Obstet Gynecol* 194.3 (mar. de 2006), págs. 664-673. doi: 10.1016/j.ajog.2006.01.101.
- [54] Y. Fukuchi, H. Nakajima, D. Sugiyama, I. Hirose, T. Kitamura y K. Tsuji. "Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22.5 (ene. de 2004), págs. 649-58. doi: 10.1634/stemcells.22-5-649.
- [55] P. S. In 't Anker, S. a. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, G. M. J. S. de Groot-Swings, F. H. J. Claas, W. E. Fibbe y H. H. H. Kanhai. "Isolation of mesenchymal stem cells of fetal

- or maternal origin from human placenta." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22.7 (ene. de 2004), págs. 1338-45. doi: 10.1634/stemcells.2004-0058.
- [56] D. Schmidt, A. Mol, C. Breymann, J. Achermann, B. Odermatt, M. Gössi, S. Neuenschwander, R. Prêtre, M. Genoni, G. Zund y S. P. Hoerstrup. "Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors." En: *Circulation* 114.1 Suppl (jul. de 2006), págs. I125-31. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001040.
- [57] C.-M. Chang, C.-L. Kao, Y.-L. Chang, M.-J. Yang, C. Chen, L. Sung, T.-H. Tsai, K.-C. Chao, S.-H. Chiou y H.-H. Ku. "Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells." En: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357.2 (jun. de 2007), págs. 414-420. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.157.
- [58] C.-C. Chien, B. L. Yen, K. Lee, T.-H. Lai, Y.-C. Chen, S.-H. Chan y H.-I. Huang. "In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells." En: *Stem Cells* 24.7 (jul. de 2006), págs. 1759-1768. doi: 10.1634/stemcells.2005-0521.
- [59] B. L. Yen, C.-C. Chien, Y.-C. Chen, J.-T. Chen, J.-S. Huang, K. Lee y H.-I. Huang. "Placenta-derived multipotent cells differentiate into neuronal and glial cells in vitro." En: *Tissue Eng Part A* 14.1 (ene. de 2008), págs. 9-17. doi: 10.1089/ten.a.2006.0352.
- [60] P. D. Coppi, G. Bartsch, M. M. Siddiqui, T. Xu, C. C. Santos, L. Perin, G. Mostoslavsky, A. C. Serre, E. Y. Snyder, J. J. Yoo, M. E. Furth, S. Soker y A. Atala. "Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy." En: *Nature Biotechnology* 25.1 (ene. de 2007), págs. 100-106. doi: 10.1038/nbt1274.
- [61] J. Kim, Y. Lee, H. Kim, K. J. Hwang, H. C. Kwon, S. K. Kim, D. J. Cho, S. G. Kang y J. You. "Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells." En: *Cell proliferation* 40.1 (feb. de 2007), págs. 75-90. doi: 10.1111/j.1365-2184.2007.00414.x.
- [62] P. Bossolasco, T. Montemurro, L. Cova, S. Zangrossi, C. Calzarossa, S. Buiatiotis, D. Soligo, S. Bosari, V. Silani, G. L. Deliliers, P. Rebulla y L. Lazzari. "Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential." En: *Cell research* 16.4 (abr. de 2006), págs. 329-36. doi: 10.1038/sj.cr.7310043.
- [63] M.-S. Tsai, J.-L. Lee, J. Chang y S.-M. Hwang. "Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol." En: *Human reproduction (Oxford, England)* 19.6 (jun. de 2004), págs. 1450-6. doi: 10.1093/humrep/deh279.
- [64] Y. M. Kolambkar, A. Peister, S. Soker, A. Atala y R. E. Guldberg. "Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells." En: *Journal of molecular histology* 38.5 (oct. de 2007), págs. 405-13. doi: 10.1007/s10735-007-9118-1.
- [65] M. Wang, Y. Yang, D. Yang, F. Luo, W. Liang, S. Guo y J. Xu. "The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro." En: *Immunology* 126.2 (feb. de 2009), págs. 220-32. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02891.x.
- [66] M. Secco, E. Zucconi, N. M. Vieira, L. L. Q. Fogaça, A. Cerqueira, M. D. F. Carvalho, T. Jazedje, O. K. Okamoto, A. R. Muotri y M. Zatz. "Mesenchymal stem cells from umbilical cord: do not discard the cord!" En: *Neuromuscul Disord* 18.1 (ene. de 2008), págs. 17-18. doi: 10.1016/j.nmd.2007.11.003.
- [67] Y. Zhao, H. Wang y T. Mazzone. "Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics." En: *Experimental Cell Research* 312.13 (ago. de 2006), págs. 2454-2464. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.04.008.
- [68] J. Sanchez-Ramos, S. Song, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, T. B. Freeman, S. Saporta, W. Janssen, N. Patel, D. R. Cooper y P. R. Sanberg. "Adult bone mar-

- row stromal cells differentiate into neural cells in vitro." En: *Experimental neurology* 164.2 (ago. de 2000), págs. 247-56. DOI: 10.1006/exnr.2000.7389.
- [69] L. Lu, Y.-J. Liu, S.-G. Yang, Q.-J. Zhao, X. Wang, W. Gong, Z.-B. Han, Z.-S. Xu, Y.-X. Lu, D. Liu, Z.-Z. Chen y Z.-C. Han. "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials." En: *Haematologica* 91.8 (ago. de 2006), págs. 1017-1026.
- [70] C. H. Jo, O. Kim, E. Park, B. J. Kim, J. Lee, S. Kang, J. H. Lee, H. S. Han, S. H. Rhee y K. Yoon. "Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion." En: *Cell Tissue Res* 334.3 (dic. de 2008), págs. 423-433. DOI: 10.1007/s00441-008-0696-3.
- [71] C. Qiao, W. Xu, W. Zhu, J. Hu, H. Qian, Q. Yin, R. Jiang, Y. Yan, F. Mao, H. Yang, X. Wang e Y. Chen. "Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord." En: *Cell Biol Int* 32.1 (ene. de 2008), págs. 8-15. DOI: 10.1016/j.cellbi.2007.08.002.
- [72] J. W. Kim, S. Y. Kim, S. Y. Park, Y. M. Kim, J. M. Kim, M. H. Lee y H. M. Ryu. "Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord." En: *Ann Hematol* 83.12 (dic. de 2004), págs. 733-738. DOI: 10.1007/s00277-004-0918-z.
- [73] K. C. Chao, K. F. Chao, Y. S. Fu y S. H. Liu. "Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes." En: *PloS one* 3.1 (ene. de 2008), e1451. DOI: 10.1371/journal.pone.0001451.
- [74] D. T. Covas, J. L. C. Siufi, A. R. L. Silva y M. D. Orellana. "Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells". En: *Braz J Med Biol Res* 36.9 (sep. de 2003), págs. 1179-1183.
- [75] Y. A. Romanov, V. A. Svintsitskaya y V. N. Smirnov. "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord." En: *Stem Cells* 21.1 (2003), págs. 105-110. DOI: 10.1634/stemcells.21-1-105CD105(+)
cellsfromWharton'sjellyshowinvitroandinvivomyogenicdifferentiativepotential.
- [76] S. Kestendjieva, D. Kyurkchiev, G. Tsvetkova, T. Mehandjiev, A. Dimitrov, A. Nikolov y S. Kyurkchiev. "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord." En: *Cell Biol Int* 32.7 (jul. de 2008), págs. 724-732. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.02.002.
- [77] Y. Cui, H. Wang, M. Yu, T. Xu, X. Li y L. Li. "Differentiation plasticity of human fetal articular chondrocytes." En: *Otolaryngol Head Neck Surg* 135.1 (jul. de 2006), págs. 61-67. DOI: 10.1016/j.otohns.2006.02.026.
- [78] P. S. in 't Anker, W. A. Noort, S. A. Scherjon, C. K.-v. der Keur, A. B. Kruisselbrink, R. L. van Bezooijen, W. Beekhuizen, R. Willemze, H. H. H. Kanhai y W. E. Fibbe. "Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential." En: *Haematologica* 88.8 (ago. de 2003), págs. 845-852.
- [79] A. Quintin, C. Schizas, C. Scaletta, S. Jaccoud, L. A. Applegate y D. P. Pioletti. "Plasticity of fetal cartilaginous cells." En: *Cell transplantation* 19.10 (ene. de 2010), págs. 1349-57. DOI: 10.3727/096368910X506854.
- [80] P. V. Guillot, C. Gotherstrom, J. Chan, H. Kurata y N. M. Fisk. "Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25.3 (mar. de 2007), págs. 646-54. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0208.
- [81] C. Campagnoli, I. A. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono y N. M. Fisk. "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." En: *Blood* 98.8 (oct. de 2001), págs. 2396-2402.

- [82] H. E. Young, T. A. Steele, R. A. Bray, J. Hudson, J. A. Floyd, K. Hawkins, K. Thomas, T. Austin, C. Edwards, J. Cuzzourt, M. Duenzl, P. A. Lucas y A. C. Black. "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." En: *Anat Rec* 264.1 (sep. de 2001), págs. 51-62.
- [83] M.-S. Tsai, S.-M. Hwang, Y.-L. Tsai, C. Cheng, J.-L. Lee y J. Chang. "Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells." En: *Biology of Reproduction* 74.3 (mar. de 2006), págs. 545-51. doi: 10.1095/biolreprod.105.046029.
- [84] A.-R. Prusa, E. Marton, M. Rosner, G. Bernaschek y M. Hengstschlager. "Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research?" En: *Human reproduction (Oxford, England)* 18.7 (jul. de 2003), págs. 1489-93. doi: 10.1093/humrep/deg279.
- [85] T. Miki, K. Mitamura, M. a. Ross, D. B. Stolz y S. C. Strom. "Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion." En: *Journal of reproductive immunology* 75.2 (oct. de 2007), págs. 91-6. doi: 10.1016/j.jri.2007.03.017.
- [86] V. L. Battula, P. M. Bareiss, S. Treml, S. Conrad, I. Albert, S. Hojak, H. Abele, B. Schewe, L. Just, T. Skutella y H.-J. Buhring. "Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation." En: *Differentiation; research in biological diversity* 75.4 (abr. de 2007), págs. 279-91. doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00139.x.
- [87] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk e I. V. Keiliss-Borok. "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." En: *Transplantation* 17.4 (abr. de 1974), págs. 331-340.
- [88] E. Zappia, S. Casazza, E. Pedemonte, F. Benvenuto, I. Bonanni, E. Gerdoni, D. Giunti, A. Ceravolo, F. Cazzanti, F. Frassoni, G. Mancardi y A. Uccelli. "Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy." En: *Blood* 106.5 (sep. de 2005), págs. 1755-1761. doi: 10.1182/blood-2005-04-1496.
- [89] E. M. Horwitz, P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul y T. Hofmann. "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99.13 (jun. de 2002), págs. 8932-8937. doi: 10.1073/pnas.132252399.
- [90] Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada y C. M. Verfaillie. "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." En: *Nature* 418.6893 (jul. de 2002), págs. 41-49. doi: 10.1038/nature00870.
- [91] M. Tezval, H. Tezval, K. Dresing, E. K. Stuermer, M. Blaschke, K. M. Stuermer y H. Siggelkow. "Differentiation dependent expression of urocortin's mRNA and peptide in human osteoprogenitor cells: influence of BMP-2, TGF-beta-1 and dexamethasone." En: *Journal of molecular histology* 40.5-6 (oct. de 2009), págs. 331-41. doi: 10.1007/s10735-009-9244-z.
- [92] A. Winter, S. Breit, D. Parsch, K. Benz, E. Steck, H. Hauner, R. M. Weber, V. Ewerbeck y W. Richter. "Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells." En: *Arthritis Rheum* 48.2 (feb. de 2003), págs. 418-429. doi: 10.1002/art.10767.

- [93] Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita y T. Muneta. "Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source." En: *Arthritis and rheumatism* 52.8 (ago. de 2005), págs. 2521-9. DOI: 10.1002/art.21212.
- [94] R. B. Jakobsen, A. Shahdadfar, F. P. Reinholt y J. E. Brinchmann. "Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue." En: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 18.10 (oct. de 2010), págs. 1407-16. DOI: 10.1007/s00167-009-1017-4.
- [95] H. J. Lee, B. H. Choi, B.-h. Min y S. R. Park. "Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro." En: *Arthritis and rheumatism* 60.8 (ago. de 2009), págs. 2325-32. DOI: 10.1002/art.24786.
- [96] F. Barry, R. E. Boynton, B. Liu y J. M. Murphy. "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components." En: *Experimental Cell Research* 268.2 (ago. de 2001), págs. 189-200. DOI: 10.1006/excr.2001.5278.
- [97] R. E. Schwartz, M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W.-S. Hu y C. M. Verfaillie. "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." En: *The Journal of clinical investigation* 109.10 (mayo de 2002), págs. 1291-302. DOI: 10.1172/JCI15182.
- [98] M. R. Alison, R. Poulson, R. Jeffery, a. P. Dhillon, a. Quaglia, J. Jacob, M. Novelli, G. Prentice, J. Williamson y N. a. Wright. "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells." En: *Nature* 406.6793 (jul. de 2000), pág. 257. DOI: 10.1038/35018642.
- [99] C. D. Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski y F. P. Luyten. "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." En: *Arthritis Rheum* 44.8 (ago. de 2001), págs. 1928-1942. DOI: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P.
- [100] D. Widera, C. Zander, M. Heidbreder, Y. Kasperek, T. Noll, O. Seitz, B. Saldamli, H. Sudhoff, R. Sader, C. Kaltschmidt y B. Kaltschmidt. "Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells." En: *Stem Cells* 27.8 (ago. de 2009), págs. 1899-1910. DOI: 10.1002/stem.104.
- [101] J. G. Toma, I. A. McKenzie, D. Bagli y F. D. Miller. "Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin." En: *Stem Cells* 23.6 (2005), págs. 727-737. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0134.
- [102] A. N. Patel, E. Park, M. Kuzman, F. Benetti, F. J. Silva y J. G. Allickson. "Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation." En: *Cell Transplant* 17.3 (2008), págs. 303-311.
- [103] L. da Silva Meirelles, P. C. Chagastelles y N. B. Nardi. "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues." En: *Journal of Cell Science* 119.Pt 11 (jun. de 2006), págs. 2204-2213. DOI: 10.1242/jcs.02932.
- [104] R. H. Lee, B. Kim, I. Choi, H. Kim, H. S. Choi, K. Suh, Y. C. Bae y J. S. Jung. "Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue." En: *Cellular Physiology and Biochemistry* 14.4-6 (2004), págs. 311-324. DOI: 10.1159/000080341.
- [105] P. A. Conget y J. J. Minguell. "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells." En: *Journal of Cellular Physiology* 181.1 (oct. de 1999), págs. 67-73. DOI: 10.1016/j.jcph.2004.11.001.
- [106] D. C. Colter, I. Sekiya y D. J. Prockop. "Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells."

- En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.14 (jul. de 2001), págs. 7841-7845. doi: 10.1073/pnas.141221698.
- [107] D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri y P. Anversa. "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." En: *Nature* 410.6829 (abr. de 2001), págs. 701-705. doi: 10.1038/35070587.
- [108] C. M. Kolf, E. Cho y R. S. Tuan. "Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation." En: *Arthritis Res Ther* 9.1 (2007), pág. 204. doi: 10.1186/ar2116.
- [109] M. Reyes, T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie y C. M. Verfaillie. "Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells." En: *Blood* 98.9 (nov. de 2001), págs. 2615-25.
- [110] M. Reyes y C. M. Verfaillie. "Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells." En: *Annals of the New York Academy of Sciences* 938 (jun. de 2001),
- [111] M. Reyes, A. Dudek, B. Jahagirdar, L. Koodie, P. H. Marker y C. M. Verfaillie. "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." En: *The journal of clinical investigation* 109.3 (2002), págs. 337-346. doi: 10.1172/JCI14327.
- [112] M. Dominici, K. L. Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop y E. Horwitz. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." eng. En: *Cytotherapy* 8.4 (2006), págs. 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
- [113] Y. Jiang, B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes y C. M. Verfaillie. "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain." En: *Experimental hematology* 30.8 (ago. de 2002), págs. 896-904.
- [114] L. Zeng, E. Rahrmann, Q. Hu, T. Lund, L. Sandquist, M. Felten, T. D. O'Brien, J. Zhang y C. Verfaillie. "Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24.11 (nov. de 2006), págs. 2355-66. doi: 10.1634/stemcells.2005-0551.
- [115] J. M. Ryan, F. P. Barry, J. M. Murphy y B. P. Mahon. "Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection." En: *Journal of inflammation (London, England)* 2 (jul. de 2005), pág. 8. doi: 10.1186/1476-9255-2-8.
- [116] K. English, F. P. Barry, C. P. Field-Corbett y B. P. Mahon. "IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells." En: *Immunology Letters* 110.2 (jun. de 2007), págs. 91-100. doi: 10.1016/j.imlet.2007.04.001.
- [117] A. Chapel, J. M. Bertho, M. Bensidhoum, L. Fouillard, R. G. Young, J. Frick, C. Demarquay, F. Cuvelier, E. Mathieu, F. Trompier, N. Dudoignon, C. Germain, C. Mazurier, J. Aigueperse, J. Borneman, N. C. Gorin, P. Gourmelon y D. Thierry. "Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome." En: *The journal of gene medicine* 5.12 (dic. de 2003), págs. 1028-38. doi: 10.1002/jgm.452.
- [118] M. D. Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanesi, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti y A. M. Gianni. "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." En: *Blood* 99.10 (mayo de 2002), págs. 3838-3843. doi: 10.1182/blood.V99.10.3838.
- [119] X. L. Aranguren, J. D. Mccue, B. Hendrickx, X.-h. Zhu, F. Du, E. Chen, B. Pelacho, G. Abizanda, M. Uriz, S. A. Frommer, J. J. Ross, B. A. Schroeder, M. S. Seaborn, J. R. Adney, J. Hagenbrock, N. H. Harris, Y. Zhang, X. Zhang, M. H. Nelson-holte, Y. Jiang, A. D. Billiau, W. Chen, C. M. Verfaillie y A. Luttun. "Multipotent adult progenitor cells sustain

- function of ischemic limbs in mice". En: *The journal of clinical investigation* 118.2 (2008), págs. 505-514. DOI: 10.1172/JCI31153. used.
- [120] K. Takahashi y S. Yamanaka. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." En: *Cell* 126.4 (ago. de 2006), págs. 663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [121] K. Benirschke, P. Kaufmann y R. Baergen. "Anatomy and Pathology of the Umbilical Cord". En: *Pathology of the Human Placenta*. Ed. por K. Benirschke, P. Kaufmann y R. Baergen. Fifth. Springer, 1993. Cap. 12, págs. 380-451. DOI: 10.1007/0-387-26742-5_12.
- [122] K. Takechi, Y. Kuwabara y M. Mizuno. "Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells." En: *Placenta* 14.2 (1993), págs. 235-245. DOI: 10.1016/S0143-4004(05)80264-4.
- [123] A. K. Nanaev, G. Kohlen, A. P. Milovanov, S. P. Domogatsky y P. Kaufmann. "Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord." En: *Placenta* 18.1 (ene. de 1997), págs. 53-64.
- [124] K. E. Mitchell, M. L. Weiss, B. M. Mitchell, P. Martin, D. Davis, L. Morales, B. Helwig, M. Beerensrauch, K. Abou-Easa, T. Hildreth, D. Troyer y S. Medicetty. "Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia." En: *Stem Cells* 21.1 (2003), págs. 50-60. DOI: 10.1634/stemcells.21-1-50.
- [125] H.-S. Wang, S.-C. Hung, S.-T. Peng, C.-C. Huang, H.-M. Wei, J. Guo, S. Fu, M.-C. Lai y C.-C. Chen. "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22.7 (ene. de 2004), págs. 1330-7. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0013.
- [126] M. L. Weiss, S. Medicetty, A. R. Bledsoe, R. S. Rachakatla, M. Choi, S. Merchav, Y. Luo, M. S. Rao, G. Velagaleti y D. Troyer. "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24.3 (mar. de 2006), págs. 781-92. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0330.
- [127] S. Jomura, M. Uy, K. Mitchell, R. Dallsen, C. J. Bode y Y. Xu. "Potential treatment of cerebral global ischemia with Oct-4+ umbilical cord matrix cells." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25.1 (ene. de 2007), págs. 98-106. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0055.
- [128] M. L. Weiss y D. L. Troyer. "Stem cells in the umbilical cord." En: *Stem cell reviews* 2.2 (ene. de 2006), págs. 155-62. DOI: 10.1007/s12015-006-0022-y.
- [129] M. Kadivar, S. Khatami, Y. Mortazavi, M. A. Shokrgozar, M. Taghikhani y M. Soleimani. "In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells." En: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340.2 (feb. de 2006), págs. 639-647. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.047.
- [130] R. Sarugaser, D. Lickorish, D. Baksh, M. M. Hosseini y J. E. Davies. "Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors." En: *Stem Cells* 23.2 (feb. de 2005), págs. 220-229. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0166.
- [131] A. Can y S. Karahuseyinoglu. "Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25.11 (nov. de 2007), págs. 2886-95. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0417.
- [132] R. D. Lund, S. Wang, B. Lu, S. Girman, T. Holmes, Y. Sauvé, D. J. Messina, I. R. Harris, A. J. Kihm, A. M. Harmon, F.-Y. Chin, A. Gosiewska y S. K. Mistry. "Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25.3 (mar. de 2007), págs. 602-11. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0308.

- [133] M. T. Conconi, P. Burra, R. D. Liddo, C. Calore, M. Turetta, S. Bellini, P. Bo, G. G. Nussdorfer y P. P. Parnigotto. "CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential." En: *Int J Mol Med* 18.6 (dic. de 2006), págs. 1089-1096.
- [134] M. Secco, E. Zucconi, N. M. Vieira, L. L. Q. Fogaça, A. Cerqueira, M. D. F. Carvalho, T. Jazedje, O. K. Okamoto, A. R. Muotri y M. Zatz. "Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood!" En: *Stem Cells* 26.1 (ene. de 2008), págs. 146-150. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0381.
- [135] D. L. Troyer y M. L. Weiss. "Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26.3 (mar. de 2008), págs. 591-9. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0439.
- [136] C. van de Ven, D. Collins, M. B. Bradley, E. Morris y M. S. Cairo. "The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration." En: *Experimental hematology* 35.12 (dic. de 2007), págs. 1753-65. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.08.017.
- [137] D. Baksh, R. Yao y R. S. Tuan. "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow." En: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25.6 (jun. de 2007), págs. 1384-92. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0709.
- [138] S. Karahuseyinoglu, O. Cinar, E. Kilic, F. Kara, G. G. Akay, D. O. Demiralp, A. Tukan, D. Uckan y A. Can. "Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys." En: *Stem Cells* 25.2 (feb. de 2007), págs. 319-331. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0286.
- [139] Y. Fu, Y. Cheng, M. A. Lin, H. Cheng, P. Chu, S. Chou, Y. Shih, M. Ko y M. Sung. "Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism." En: *Stem Cells* 24.1 (ene. de 2006), págs. 115-124. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0053.
- [140] L. Ma, B. Sun, L. Hood y Q. Tian. "Molecular profiling of stem cells." En: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 378.1-2 (mar. de 2007), págs. 24-32. DOI: 10.1016/j.cca.2006.12.016.
- [141] K. H. Wu, B. Zhou, S. H. Lu, B. Feng, S. G. Yang, W. T. Du, D. S. Gu, Z. C. Han e Y. L. Liu. "In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells." En: *Journal of Cellular Biochemistry* 100.3 (feb. de 2007), págs. 608-16. DOI: 10.1002/jcb.21078.
- [142] V. A. Farias, J. L. Linares-Fernández, J. L. Peñalver, J. a. Payá Colmenero, G. O. Ferrón, E. L. Duran, R. M. Fernández, E. G. Olivares, F. O'Valle, a. Puertas, F. J. Oliver y J. M. Ruiz de Almodóvar. "Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties." En: *Placenta* 32.1 (ene. de 2011), págs. 86-95. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.11.003.
- [143] A. Giordano, U. Galderisi e I. R. Marino. "From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells." En: *Journal of Cellular Physiology* 211.1 (abr. de 2007), págs. 27-35. DOI: 10.1002/jcp.20959.
- [144] S. E. Haynesworth, J. Goshima, V. M. Goldberg y A. I. Caplan. "Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow." En: *Bone* 13.1 (1992), págs. 81-88. DOI: 10.1016/8756-3282(92)90364-3.
- [145] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig y D. R. Marshak. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." En: *Science* 284.5411 (abr. de 1999), págs. 143-147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.

- [146] Z.-Y. Zhang, S. H. Teoh, W.-S. Chong, T.-T. Foo, Y.-C. Chng, M. Choolani y J. Chan. "A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering." En: *Biomaterials* 30.14 (mayo de 2009), págs. 2694-2704. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.028.
- [147] L. da Silva Meirelles, A. I. Caplan y N. B. Nardi. "In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells." En: *Stem Cells* 26.9 (sep. de 2008), págs. 2287-2299. doi: 10.1634/stemcells.2007-1122.
- [148] S. Karahuseyinoglu, C. Kocafe, D. Balci, E. Erdemli y A. Can. "Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells." En: *Stem Cells* 26.3 (mar. de 2008), págs. 682-691. doi: 10.1634/stemcells.2007-0738.
- [149] T. Kinnaird, E. Stabile, M. S. Burnett, M. Shou, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs y S. E. Epstein. "Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms." En: *Circulation* 109.12 (mar. de 2004), págs. 1543-1549. doi: 10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57.
- [150] A. Al-Khalidi, H. Al-Sabti, J. Galipeau y K. Lachapelle. "Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model." En: *Ann Thorac Surg* 75.1 (ene. de 2003), págs. 204-209. doi: 10.1016/S0003-4975(02)04291-1.
- [151] T. Iwase, N. Nagaya, T. Fujii, T. Itoh, S. Murakami, T. Matsumoto, K. Kangawa y S. Kitamura. "Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia." En: *Cardiovascular Research* 66.3 (jun. de 2005), págs. 543-551. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.02.006.
- [152] M. H. Moon, S. Y. Kim, Y. J. Kim, S. J. Kim, J. B. Lee, Y. C. Bae, S. M. Sung y J. S. Jung. "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia." En: *Cellular Physiology and Biochemistry* 17.5-6 (2006), págs. 279-290. doi: 10.1159/000094140.
- [153] M. F. Pittenger y B. J. Martin. "Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics." En: *Circulation Research* 95.1 (jul. de 2004), págs. 9-20. doi: 10.1161/01.RES.0000135902.99383.6f.
- [154] S.-Y. Joo, K.-A. Cho, Y.-J. Jung, H.-S. Kim, S.-Y. Park, Y.-B. Choi, K.-M. Hong, Y. Woo, Y. Seoh, S. J. Cho y K.-H. Ryu. "Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner." En: *Cytotherapy* 12.3 (mayo de 2010), págs. 361-370. doi: 10.3109/14653240903502712.
- [155] S. P. Bruder, N. Jaiswal y S. E. Haynesworth. "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation." En: *Journal of Cellular Biochemistry* 64.2 (feb. de 1997), págs. 278-294.
- [156] H. Majd, P.-J. Wipff, L. Buscemi, M. Bueno, D. Vonwil, T. M. Quinn y B. Hinz. "A novel method of dynamic culture surface expansion improves mesenchymal stem cell proliferation and phenotype." En: *Stem Cells* 27.1 (ene. de 2009), págs. 200-209. doi: 10.1634/stemcells.2008-0674.
- [157] E. Schmelzer, K. Mutig, P. Schrade, S. Bachmann, J. C. Gerlach y K. Zeilinger. "Effect of human patient plasma ex vivo treatment on gene expression and progenitor cell activation of primary human liver cells in multi-compartment 3D perfusion bioreactors for extra-corporeal liver support." En: *Biotechnology and Bioengineering* 103.4 (jul. de 2009), págs. 817-827. doi: 10.1002/bit.22283.
- [158] M. Blazewicz. "Carbon materials in the treatment of soft and hard tissue injuries." En: *Eur Cell Mater* 2 (ago. de 2001), págs. 21-29.

- [159] A. Fraczek, E. Menaszek, C. Paluszkiwicz y M. Blazewicz. "Comparative in vivo biocompatibility study of single- and multi-wall carbon nanotubes." En: *Acta Biomater* 4.6 (nov. de 2008), págs. 1593-1602. doi: 10.1016/j.actbio.2008.05.018.
- [160] J. L. Peñalver, J.-L. Linares-Fernández, V. D. A. Fariás, M. V. López-Ramón, M. Tassi, F. J. Oliver, C. Moreno-Castilla y J. M. R. D. Almodóvar. "Activated carbon cloth as support for mesenchymal stem cell growth and differentiation to osteocytes." En: *Carbon* 47.15 (dic. de 2009), págs. 3574-3577. doi: 10.1016/j.carbon.2009.08.016.
- [161] C. Moreno-Castilla, M. A. Alvarez-Merino, M. V. López-Ramón y J. Rivera-Utrilla. "Cadmium ion adsorption on different carbon adsorbents from aqueous solutions. Effect of surface chemistry, pore texture, ionic strength, and dissolved natural organic matter." En: *Langmuir* 20.19 (sep. de 2004), págs. 8142-8148. doi: 10.1021/la049253m.
- [162] E. Mooney, P. Dockery, U. Greiser, M. Murphy y V. Barron. "Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation." En: *Nano Letters* 8.8 (ago. de 2008), págs. 2137-2143. doi: 10.1021/nl1073300o.
- [163] E. D. O'Ceirbhail, M. A. Punchard, M. Murphy, F. P. Barry, P. E. McHugh y V. Barron. "Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate." En: *Biomaterials* 29.11 (abr. de 2008), págs. 1610-1619. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.042.
- [164] C. Y. Tay, H. Gu, W. S. Leong, H. Yu, H. Q. Li, B. C. Heng, H. Tintang, S. C. J. Loo, L. J. Li y L. P. Tan. "Cellular behavior of human mesenchymal stem cells cultured on single-walled carbon nanotube film." En: *Carbon* 48.4 (2010), págs. 1095 -1104. doi: 10.1016/j.carbon.2009.11.031.
- [165] E. López, R. Guerrero, M. I. Núñez, R. del Moral, M. Villalobos, J. Martínez-Galán, M. T. Valenzuela, J. A. Muñoz-Gámez, F. J. Oliver, D. Martín-Oliva y J. M. R. de Almodóvar. "Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes." En: *Breast Cancer Res* 7.5 (2005), R690-R698. doi: 10.1186/bcr1277.
- [166] B. Pinar, P. C. Lara, M. Lloret, E. Bordón, M. I. Núñez, M. Villalobos, R. Guerrero, J. D. Luna y J. M. R. de Almodóvar. "Radiation-induced DNA damage as a predictor of long-term toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy." En: *Radiation Research* 168.4 (oct. de 2007), págs. 415-422. doi: 10.1667/RR0746.1.
- [167] N. G. Burnet, J. Johansen, I. Turesson, J. Nyman y J. H. Peacock. "Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy." En: *International Journal of Cancer* 79.6 (dic. de 1998), págs. 606-613. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19981218)79:6<606::AID-IJC9>3.0.CO;2-Y.
- [168] N. G. Burnet, J. Nyman, I. Turesson, R. Wurm, J. R. Yarnold y J. H. Peacock. "Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity." En: *Lancet* 339.8809 (jun. de 1992), págs. 1570-1571. doi: 10.1016/0140-6736(92)91833-T.
- [169] M. I. Núñez, M. R. Guerrero, E. López, M. R. del Moral, M. T. Valenzuela, E. Siles, M. Villalobos, V. Pedraza, J. H. Peacock y J. M. Ruiz de Almodóvar. "DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells." En: *International Journal of Cancer* 76.3 (mayo de 1998), págs. 354-361. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980504)76:3<354::AID-IJC12>3.0.CO;2-B.

- [170] C. M. L. West, M. J. McKay, T. Hölscher, M. Baumann, I. J. Stratford, R. G. Bristow, M. Iwakawa, T. Imai, S. M. Zingde, M. S. Anscher, J. Bourhis, A. C. Begg, K. Haustermans, S. M. Bentzen y J. H. Hendry. "Molecular markers predicting radiotherapy response: report and recommendations from an International Atomic Energy Agency technical meeting." En: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62.5 (ago. de 2005), págs. 1264-1273. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2005.05.001.
- [171] J. M. Ruiz de Almodóvar, M. I. Núñez, T. J. McMillan, N. Olea, C. Mort, M. Villalobos, V. Pedraza y G. G. Steel. "Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity." En: *Br J Cancer* 69.3 (mar. de 1994), págs. 457-462. DOI: 10.1038/bjc.1994.83.
- [172] J. M. Ruiz de Almodóvar, C. Bush, J. H. Peacock, G. G. Steel, S. J. Whitaker y T. J. McMillan. "Dose-rate effect for DNA damage induced by ionizing radiation in human tumor cells." En: *Radiation Research* 138.1 Suppl (abr. de 1994), S93-S96.
- [173] M. I. Núñez, M. Villalobos, N. Olea, M. T. Valenzuela, V. Pedraza, T. J. McMillan y J. M. Ruiz de Almodóvar. "Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells." En: *Br J Cancer* 71.2 (feb. de 1995), págs. 311-316.
- [174] M. T. Valenzuela, M. I. Núñez, M. Villalobos, E. Siles, T. J. McMillan, V. Pedraza y J. M. Ruiz de Almodóvar. "A comparison of p53 and p16 expression in human tumor cells treated with hyperthermia or ionizing radiation." En: *International Journal of Cancer* 72.2 (jul. de 1997), págs. 307-312. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970717)72:2<307::AID-IJC18>3.0.CO;2-C.
- [175] E. Siles, M. Villalobos, M. T. Valenzuela, M. I. Núñez, A. Gordon, T. J. McMillan, V. Pedraza y J. M. R. de Almodóvar. "Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines." En: *Br J Cancer* 73.5 (mar. de 1996), págs. 581-588. DOI: 10.1038/bjc.1996.101.
- [176] J. M. Ruiz de Almodóvar, D. Guirado, M. Isabel Núñez, E. López, R. Guerrero, M. T. Valenzuela, M. Villalobos y R. del Moral. "Individualization of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity." En: *Radiother Oncol* 62.3 (mar. de 2002), págs. 327-333. DOI: 10.1016/S0167-8140(01)00490-X.
- [177] D. Guirado y J. M. Ruiz de Almodóvar. "Prediction of normal tissue response and individualization of doses in radiotherapy." En: *Phys Med Biol* 48.19 (oct. de 2003), págs. 3213-3223. DOI: 10.1088/0031-9155/48/19/008.
- [178] I. Turesson. "The progression rate of late radiation effects in normal tissue and its impact on dose-response relationships." En: *Radiother Oncol* 15.3 (jul. de 1989), págs. 217-226. DOI: 10.1016/0167-8140(89)90089-3.
- [179] S. B. Curtis. "Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation—a unified repair model." En: *Radiation Research* 106.2 (mayo de 1986), págs. 252-270. DOI: 10.2307.3576798.
- [180] C. S. Parkins y J. F. Fowler. "The linear quadratic fit for lung function after irradiation with X-rays at smaller doses per fraction than 2 Gy." En: *Br J Cancer Suppl* 7 (1986), págs. 320-323.
- [181] J. Yarnold, A. Ashton, J. Bliss, J. Homewood, C. Harper, J. Hanson, J. Haviland, S. Bentzen y R. Owen. "Fractionation sensitivity and dose response of late adverse effects in the breast after radiotherapy for early breast cancer: long-term results of a randomised trial." En: *Radiother Oncol* 75.1 (abr. de 2005), págs. 9-17. DOI: 10.1016/j.radonc.2005.01.005.
- [182] J. C. Horiot, R. Le Fur, T. N'Guyen, C. Chenal, S. Schraub, S. Alfonsi, G. Gardani, W. Van Den Bogaert, S. Danczak y M. Bolla. "Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of a randomized trial of the EORTC

- cooperative group of radiotherapy." En: *Radiother Oncol* 25.4 (dic. de 1992), págs. 231-241. DOI: 10.1016/0167-8140(92)90242-M.
- [183] C. Mothersill y C. Seymour. "Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells." En: *International Journal of Radiation Biology* 71.4 (abr. de 1997), págs. 421-427. DOI: 10.1080/095530097144030.
- [184] H. Nagasawa y J. B. Little. "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles." En: *Cancer Research* 52.22 (nov. de 1992), págs. 6394-6396.
- [185] E. I. Azzam, S. M. de T. y J. B. Little. "Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect." En: *Oncogene* 22.45 (oct. de 2003), págs. 7050-7057. DOI: 10.1038/sj.onc.1206961.
- [186] J. F. Ward. "The radiation-induced lesions which trigger the bystander effect." En: *Mutation Research* 499.2 (feb. de 2002), págs. 151-154. DOI: 10.1016/S0027-5107(01)00286-X.
- [187] O. V. Belyakov, M. Folkard, C. Mothersill, K. M. Prise y B. D. Michael. "A proliferation-dependent bystander effect in primary porcine and human urothelial explants in response to targeted irradiation." En: *Br J Cancer* 88.5 (mar. de 2003), págs. 767-774. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600804.
- [188] K. M. Prise, O. V. Belyakov, H. C. Newman, S. Patel, G. Schettino, M. Folkard y B. D. Michael. "Non-targeted effects of radiation: bystander responses in cell and tissue models." En: *Radiat Prot Dosimetry* 99.1-4 (2002), págs. 223-226.
- [189] P. Dent, A. Yacoub, P. B. Fisher, M. P. Hagan y S. Grant. "MAPK pathways in radiation responses." En: *Oncogene* 22.37 (sep. de 2003), págs. 5885-5896. DOI: 10.1038/sj.onc.1206701.
- [190] K. M. Prise y J. M. O'Sullivan. "Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy." En: *Nature Reviews Cancer* 9.5 (mayo de 2009), págs. 351-360. DOI: 10.1038/nrc2603.
- [191] D. T. Goodhead. "New radiobiological, radiation risk and radiation protection paradigms." En: *Mutation Research* 687.1-2 (mayo de 2010), págs. 13-16. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.01.006.
- [192] S. C. Formenti y S. Demaria. "Systemic effects of local radiotherapy." En: *Lancet Oncol* 10.7 (jul. de 2009), págs. 718-726. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70082-8.
- [193] J. F. Fowler. "21 years of biologically effective dose." En: *Br J Radiol* 83.991 (jul. de 2010), págs. 554-568. DOI: 10.1259/bjr/31372149.
- [194] W. M. Mendenhall, C. E. Riggs, M. Vaysberg, R. J. Amdur y J. W. Werning. "Altered fractionation and adjuvant chemotherapy for head and neck squamous cell carcinoma." En: *Head Neck* 32.7 (jul. de 2010), págs. 939-945. DOI: 10.1002/hed.21261.
- [195] M. T. Valenzuela, R. Guerrero, M. I. Núñez, J. M. R. D. Almodóvar, M. Sarker, G. de Murcia y F. J. Oliver. "PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response." En: *Oncogene* 21.7 (feb. de 2002), págs. 1108-1116. DOI: 10.1038/sj.onc.1205169.
- [196] S. Rozen y H. Skaletsky. "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." En: *Methods Mol Biol* 132 (2000), págs. 365-386. DOI: 10.1385/1-59259-192-2:365.
- [197] P. Chomczynski y N. Sacchi. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." En: *Analytical Biochemistry* 162.1 (abr. de 1987), págs. 156-159. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.
- [198] R. Muñoz-Fernández, F. J. Blanco, C. Frecha, F. Martín, M. Kimatrai, A. C. Abadía-Molina, J. M. García-Pacheco y E. G. Olivares. "Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts." En: *Journal of Immunology* 177.1 (jul. de 2006), págs. 280-289.

- [199] O. Garcia, I. Romero, J. E. González y T. Mandina. "Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software." En: *Mutation Research* 627.2 (mar. de 2007), págs. 186-190. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.11.007.
- [200] K. Końca, A. Lankoff, A. Banasik, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Góźdź, Z. Koza y A. Wojcik. "A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay." En: *Mutation Research* 534.1-2 (ene. de 2003), págs. 15-20. doi: 10.1016/S1383-5718(02)00251-6.
- [201] J. H. Peacock, M. R. de Almodóvar, T. J. McMillan y G. G. Steel. "The nature of the initial slope of radiation cell survival curves." eng. En: *BJR Suppl* 24 (1992), págs. 57-60.
- [202] B. Marples y M. C. Joiner. "The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population." eng. En: *Radiation Research* 133.1 (ene. de 1993), págs. 41-51.
- [203] R. Friedman, M. Betancur, L. Boissel, H. Tuncer, C. Cetrulo y H. Klingemann. "Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation." eng. En: *Biol Blood Marrow Transplant* 13.12 (dic. de 2007), págs. 1477-1486. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.08.048.
- [204] A. J. Halayko, H. Salari, X. MA y N. L. Stephens. "Markers of airway smooth muscle cell phenotype." eng. En: *American Journal of Physiology* 270.6 Pt 1 (jun. de 1996), págs. L1040-L1051.
- [205] J. P. Remy-Martin, A. Marandin, B. Challier, G. Bernard, M. Deschaseaux, P. Herve, Y. Wei, T. Tsuji, R. Auerbach, J. E. Dennis, K. A. Moore, J. S. Greenberger y P. Charbord. "Vascular smooth muscle differentiation of murine stroma: a sequential model." eng. En: *Exp Hematol* 27.12 (dic. de 1999), págs. 1782-1795.
- [206] E. Gottfried, L. A. Kunz-Schughart, A. Weber, M. Rehli, A. Peuker, A. Müller, M. Kastenberger, G. Brockhoff, R. Andreesen y M. Kreutz. "Expression of CD68 in non-myeloid cell types." eng. En: *Scand J Immunol* 67.5 (mayo de 2008), págs. 453-463. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x.
- [207] E. Freisinger, C. Cramer, X. Xia, S. N. Murthy, D. P. Slakey, E. Chiu, E. R. Newsome, E. U. Alt y R. Izadpanah. "Characterization of hematopoietic potential of mesenchymal stem cells." eng. En: *Journal of Cellular Physiology* 225.3 (nov. de 2010), págs. 888-897. doi: 10.1002/jcp.22299.
- [208] A. C. Lloyd. "Limits to lifespan." eng. En: *Nature Cell Biology* 4.2 (feb. de 2002), E25-E27. doi: 10.1038/ncb0202-e25.
- [209] A. Lavrentieva, I. Majore, C. Kasper y R. Hass. "Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells." eng. En: *Cell Commun Signal* 8 (2010), pág. 18. doi: 10.1186/1478-811X-8-18.
- [210] R. Sarugaser, L. Hanoun, A. Keating, W. L. Stanford y J. E. Davies. "Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy." En: *PLoS One* 4.8 (2009), e6498. doi: 10.1371/journal.pone.0006498.
- [211] C. Fehrer, R. Brunauer, G. Laschober, H. Unterluggauer, S. Reitingner, F. Kloss, C. Gully, R. Gassner y G. Lepperdinger. "Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan." eng. En: *Aging Cell* 6.6 (dic. de 2007), págs. 745-757. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x.
- [212] W. L. Grayson, F. Zhao, B. Bunnell y T. Ma. "Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells." eng. En: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358.3 (jul. de 2007), págs. 948-953. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.054.
- [213] F. D. Santos, P. Z. Andrade, J. S. Boura, M. M. Abecasis, C. L. da Silva y J. M. S. Cabral. "Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kine-

- tics and metabolism under hypoxia.” eng. En: *Journal of Cellular Physiology* 223.1 (abr. de 2010), págs. 27-35. doi: 10.1002/jcp.21987.
- [214] Y.-C. Huang, Z.-M. Yang, N.-G. Jiang, X.-H. Chen, X.-Q. Li, M.-Y. Tan, K.-P. Zhou, L. Tang, H.-Q. Xie y L. Deng. “Characterization of MSCs from human placental decidua basalis in hypoxia and serum deprivation.” eng. En: *Cell Biol Int* 34.3 (mar. de 2010), págs. 237-243. doi: 10.1042/CBI20090044.
- [215] C. Chaponnier y G. Gabbiani. “Pathological situations characterized by altered actin isoform expression.” eng. En: *J Pathol* 204.4 (nov. de 2004), págs. 386-395. doi: 10.1002/path.1635.
- [216] G. Majno, G. Gabbiani, B. J. Hirschel, G. B. Ryan y P. R. Statkov. “Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle.” eng. En: *Science* 173.996 (ago. de 1971), págs. 548-550.
- [217] B. Hinz. “Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.” eng. En: *Journal of Investigative Dermatology* 127.3 (mar. de 2007), págs. 526-537. doi: 10.1038/sj.jid.5700613.
- [218] J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier y R. A. Brown. “Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.” eng. En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3.5 (mayo de 2002), págs. 349-363. doi: 10.1038/nrm809.
- [219] V. Drobic, R. H. Cunningham, K. M. Bedosky, J. E. Raizman, V. V. Elimban, S. G. Rattan e I. M. C. Dixon. “Differential and combined effects of cardiotrophin-1 and TGF-beta1 on cardiac myofibroblast proliferation and contraction.” eng. En: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293.2 (ago. de 2007), H1053-H1064. doi: 10.1152/ajpheart.00935.2006.
- [220] L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.-P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer y L. Zitvogel. “Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy.” eng. En: *Nat Med* 13.9 (sep. de 2007), págs. 1050-1059. doi: 10.1038/nm1622.
- [221] O. Momcilović, S. Choi, S. Varum, C. Bakkenist, G. Schatten y C. Navara. “Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G(2) but not G(1) cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells.” eng. En: *Stem Cells* 27.8 (ago. de 2009), págs. 1822-1835. doi: 10.1002/stem.123.
- [222] M. B. Sowa, W. Goetz, J. E. Baulch, D. N. Pyles, J. Dziegielewski, S. Yovino, A. R. Snyder, S. M. de Toledo, E. I. Azzam y W. F. Morgan. “Lack of evidence for low-LET radiation induced bystander response in normal human fibroblasts and colon carcinoma cells.” eng. En: *International Journal of Radiation Biology* 86.2 (feb. de 2010), págs. 102-113. doi: 10.1093/ijro/9553000903419957.
- [223] N. Cogan, D. M. Baird, R. Phillips, L. A. Crompton, M. A. Caldwell, M. A. Rubio, R. Newson, F. Lyng y C. P. Case. “DNA damaging bystander signalling from stem cells, cancer cells and fibroblasts after Cr(VI) exposure and its dependence on telomerase.” eng. En: *Mutation Research* 683.1-2 (ene. de 2010), págs. 1-8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.09.012.
- [224] E. Segezdi, A. O’Reilly, Y. Davy, R. Vawda, D. L. Taylor, M. Murphy, A. Samali y H. Mehmet. “Stem cells are resistant to TRAIL receptor-mediated apoptosis.” eng. En: *J Cell Mol Med* 13.11-12 (2009), págs. 4409-4414. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00522.x.
- [225] G. Grisendi, R. Bussolari, L. Cafarelli, I. Petak, V. Rasini, E. Veronesi, G. D. Santis, C. Spano, M. Tagliazzucchi, H. Barti-Juhasz, L. Scarabelli, F. Bambi, A. Frassoldati, G. Rossi, C. Casali, U. Morandi, E. M. Horwitz, P. Paolucci, P. Conte y M. Dominici. “Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-

- inducing ligand delivery for cancer therapy.” eng. En: *Cancer Research* 70.9 (mayo de 2010), págs. 3718-3729. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1865.
- [226] B. Thayaparasingham, A. Kunz, N. Peters y D. Kulms. “Sensitization of melanoma cells to TRAIL by UVB-induced and NF-kappaB-mediated downregulation of xIAP.” eng. En: *Oncogene* 28.3 (ene. de 2009), págs. 345-362. doi: 10.1038/onc.2008.397.
- [227] T. Haapajarvi, K. Pitkänen y M. Laiho. “Human melanoma cell line UV responses show independency of p53 function.” eng. En: *Cell Growth Differ* 10.3 (mar. de 1999), págs. 163-171.
- [228] J. Rzeszowska-Wolny, R. Herok, M. Widel y R. Hancock. “X-irradiation and bystander effects induce similar changes of transcript profiles in most functional pathways in human melanoma cells.” eng. En: *DNA Repair (Amst)* 8.6 (jun. de 2009), págs. 732-738. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.02.001.
- [229] C. E. Mothersill, M. J. Moriarty y C. B. Seymour. “Radiotherapy and the potential exploitation of bystander effects.” eng. En: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58.2 (feb. de 2004), págs. 575-579.
- [230] S. Burdak-Rothkamm, S. C. Short, M. Folkard, K. Rothkamm y K. M. Prise. “ATR-dependent radiation-induced gamma H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells.” eng. En: *Oncogene* 26.7 (feb. de 2007), págs. 993-1002. doi: 10.1038/sj.onc.1209863.
- [231] P. Lambin, B. Marples, B. Fertil, E. P. Malaise y M. C. Joiner. “Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses.” eng. En: *International Journal of Radiation Biology* 63.5 (mayo de 1993), págs. 639-650.
- [232] P. Lambin, E. P. Malaise y M. C. Joiner. “The effect of very low radiation doses on the human bladder carcinoma cell line RT112.” eng. En: *Radiother Oncol* 32.1 (jul. de 1994), págs. 63-72.
- [233] S. C. Gamble, M. J. Dunn, C. H. Wheeler, M. C. Joiner, A. Adu-Poku y J. E. Arrand. “Expression of proteins coincident with inducible radioprotection in human lung epithelial cells.” eng. En: *Cancer Research* 60.8 (abr. de 2000), págs. 2146-2151.
- [234] J. S. Dickey, B. J. Baird, C. E. Redon, M. V. Sokolov, O. A. Sedelnikova y W. M. Bonner. “Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction.” En: *Carcinogenesis* 30.10 (oct. de 2009), págs. 1686-1695. doi: 10.1093/carcin/bgp192.
- [235] L. S. Sasportas, R. Kasmieh, H. Wakimoto, S. Hingtgen, J. A. J. M. van de Water, G. Mohapatra, J. L. Figueiredo, R. L. Martuza, R. Weissleder y K. Shah. “Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy.” eng. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.12 (mar. de 2009), págs. 4822-4827. doi: 10.1073/pnas.0806647106.
- [236] A. Ashkenazi y V. M. Dixit. “Apoptosis control by death and decoy receptors.” eng. En: *Current Opinion in Cell Biology* 11.2 (abr. de 1999), págs. 255-260.
- [237] M. H. Barcellos-Hoff y A. L. Brooks. “Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability.” eng. En: *Radiation Research* 156.5 Pt 2 (nov. de 2001), págs. 618-627.
- [238] S. Burdak-Rothkamm, K. Rothkamm y K. M. Prise. “ATM acts downstream of ATR in the DNA damage response signaling of bystander cells.” eng. En: *Cancer Research* 68.17 (sep. de 2008), págs. 7059-7065. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0545.
- [239] C. Mothersill y C. B. Seymour. “Radiation-induced bystander effects—implications for cancer.” eng. En: *Nature Reviews Cancer* 4.2 (feb. de 2004), págs. 158-164. doi: 10.1038/nrc1277.
- [240] M. M. Shareef, N. Cui, R. Burikhanov, S. Gupta, S. Satishkumar, S. Shajahan, M. Mohiuddin, V. M. Rangnekar y M. M. Ahmed. “Role of tumor necrosis factor-alpha and TRAIL in high-dose radiation-induced bystander signaling in lung adenocarcinoma.” eng. En: *Can-*

- cer Research* 67.24 (dic. de 2007), págs. 11811-11820. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0722.
- [241] S. A. Ghandhi, B. Yaghoubian y S. A. Amundson. "Global gene expression analyses of bystander and alpha particle irradiated normal human lung fibroblasts: synchronous and differential responses." eng. En: *BMC Med Genomics* 1 (2008), pág. 63. DOI: 10.1186/1755-8794-1-63.
- [242] T. K. Hei, H. Zhou, V. N. Ivanov, M. Hong, H. B. Lieberman, D. J. Brenner, S. A. Amundson y C. R. Geard. "Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model." eng. En: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60.8 (ago. de 2008), págs. 943-950. DOI: 10.1211/jpp.60.8.0001.
- [243] A. Luce, A. Courtin, C. Levalois, S. Altmeyer-Morel, P.-H. Romeo, S. Chevillard y J. Lebeau. "Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells." eng. En: *Carcinogenesis* 30.3 (mar. de 2009), págs. 432-439. DOI: 10.1093/carcin/bgp008.
- [244] H. Miletic, Y. Fischer, S. Litwak, T. Giroglou, Y. Waerzeggers, A. Winkeler, H. Li, U. Himmelreich, C. Lange, W. Stenzel, M. Deckert, H. Neumann, A. H. Jacobs y D. von Laer. "Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene." eng. En: *Molecular Therapy* 15.7 (jul. de 2007), págs. 1373-1381. DOI: 10.1038/mt.sj.6300155.
- [245] K. Nakamura, Y. Ito, Y. Kawano, K. Kurozumi, M. Kobune, H. Tsuda, A. Bizen, O. Honmou, Y. Niitsu y H. Hamada. "Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model." eng. En: *Gene Therapy* 11.14 (jul. de 2004), págs. 1155-1164. DOI: 10.1038/sj.gt.3302276.
- [246] B. Marples, B. G. Wouters y M. C. Joiner. "An association between the radiation-induced arrest of G2-phase cells and low-dose hyper-radiosensitivity: a plausible underlying mechanism?" eng. En: *Radiation Research* 160.1 (jul. de 2003), págs. 38-45.
- [247] M. A. Ebert, N. Suchowerska, M. A. Jackson y D. R. McKenzie. "A mathematical framework for separating the direct and bystander components of cellular radiation response." eng. En: *Acta Oncol* 49.8 (nov. de 2010), págs. 1334-1343. DOI: 10.3109/0284186X.2010.487874.
- [248] V. de Araujo Farias, J. L. Peñalver, J. Linares, M. López-Ramón, F. Oliver, C. Moreno-Castilla y J. R. de Almodóvar. "Tela de Carbón activo: biomateriales para la proliferación y diferenciación de células mesenquimales". En: *Boletín Español del Carbón*. pendiente de publicar.
- [249] J. Gómez-Millán, I. S. S. Katz, V. de Araujo Farias, J.-L. Linares-Fernández, J. López-Peñalver, G. Ortiz-Ferrón, C. Ruiz-Ruiz, F. J. Oliver y J. M. R. de Almodóvar. "The importance of bystander effects in radiation therapy in melanoma skin-cancer cells and umbilical-cord stromal stem cells." eng. En: *Radiother Oncol* (dic. de 2011). DOI: 10.1016/j.radonc.2011.11.002.
- [250] V. de Araujo Farias, J. Gómez-Millán, I. S. S. Katz, J.-l. Linares-Fernández, J. L. Peñalver, G. O. Ferrón, C. Ruiz-Ruiz, F. J. Oliver y J. M. R. de Almodóvar. "The importance of bystander effects in melanoma skin-cancer cells and umbilical-cord stromal stem cells". Inglés. En: *X Aporeunión*. Red española de apoptosis - APORED. 2011.
- [251] J. J. López-Peñalver, J. L. Linares, V. de Araújo Farias, M. V. López-Ramón, F. J. Oliver, C. Moreno-Castilla y J. M. R. de Almodóvar. "Telas de carbón activado como soporte para el crecimiento de células madre". Spanish. En: *X Reunión del Grupo Español del Carbón*. Grupo Español del Carbón. 2010.
- [252] V. de Araújo Farias, J.-L. Linares-Fernández, S. R. Arrabal, J. L. Peñalver, J. Payá-Colmenero, G. Ortiz-Ferrón, E. Leno-Durán, R. Muñoz-Fernández, E. G. Olivares, F. O'Valle, A. Puer-

tas, F. J. Oliver y J. M. R. de Almodóvar. "Characterization of human umbilical cord matrix stem cells under improved culture conditions". Inglés. En: *Vth Biennial Congress Spanish Society of Gene and Cell Therapy. Human Gene Therapy*. Vol. 37. Sociedad Española de Terapia Génica Y Celular. Granada: Mary Ann Liebert, Inc, 2009, págs. 1062-1062.

Consentimiento informado



Centro de Investigación Biomédica
Universidad de Granada
Hospital Universitario San Cecilio
Hospital Universitario Virgen de las Nieves

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto de investigación

“Cultivo extensivo de células stem pluripotenciales adultas, obtenidas a partir de cordón umbilical humano, en un bioreactor”

El proyecto ha sido promovido por el Centro de Investigación Biomédica conjuntamente con los Hospitales Universitarios “San Cecilio” y “Virgen de las Nieves” de Granada y su objetivo fundamental es el estudio de la proliferación celular y de su control en el laboratorio con la finalidad de poder trasladar los conocimientos que se obtengan a la práctica clínica.

Invitación a su participación

El proyecto para el que solicitamos su autorización ha sido promovido por el Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa del Centro de Investigación Biomédica (CIBM) y uno de sus objetivos es la obtención de células madre pluripotenciales a partir del cordón umbilical. Para su desarrollo se necesita un fragmento del cordón umbilical que se obtendrá en el paritorio en condiciones de seguridad si ustedes aceptan participar en el proyecto.

El Grupo de Investigación Oncología e Inmunología Molecular (CTS-434, Junta de Andalucía) cuyos laboratorios están ubicados en el Centro de Investigación Biomédica ha iniciado este proyecto de investigación. Usted está invitada a participar después de haber sido completamente informada sobre el mismo.

Introducción

Es bien conocido que las posibilidades de la Medicina Regenerativa en el tratamiento de las enfermedades está abriendo un campo de investigación de enorme interés. Se sugiere que mediante terapia celular se podría lograr la curación de enfermedades para las que hoy carecemos de remedios eficaces. Previendo esta posibilidad se están desarrollando en nuestra comunidad, y en el resto de España, programas de investigación que pretenden obtener, y caracterizar, células madre de diversos orígenes. Se sabe que una fuente de este tipo de células se encuentra en la sangre del cordón umbilical. Ustedes que acaban de tener un hijo/a pueden pedir que se guarde la sangre que en el cordón umbilical quedó contenida. Para ello existe el Banco Andaluz de Sangre y Cordón Umbilical. Nosotros le pedimos que, en base a los últimos trabajos científicos publicados, y a lo que en nuestra entrevista le expondremos, permitan también que se guarde el tejido del cordón umbilical y que una porción del mismo nos sea cedida para llevar a cabo este proyecto de investigación. Del trozo de tejido que nos cedan obtendremos, en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, las células progenitoras pluripotenciales que nos servirán para estudiar su capacidad de diferenciación. Con ello intentaremos buscar el avance de la Terapia Celular y de la Medicina Regenerativa.

Objetivo

Las técnicas basadas en la terapia celular y la medicina regenerativa necesitan de la expansión de las células con capacidad regenerativa. Este proceso de expansión se realiza a través del cultivo de las mismas en laboratorios especializados. Considerando que la utilidad de las células pluripotenciales mesenquimales (MSC) en aplicaciones clínicas es cada vez más prometedora, y que es necesario encontrar fuentes de células mesenquimales que sean seguras y proporcionen células pluripotenciales fáciles de cultivar hemos decidido explorar la posibilidad de coleccionar células MSCs partiendo del tejido perivasculoso (Wharton jelly) del cordón umbilical humano para hacerlas crecer masivamente sobre un bioreactor que diseñaremos a lo largo de este proyecto de investigación. El objetivo principal del proyecto es conseguir el material y la experiencia suficiente, para disponer de un banco de células multipotenciales adultas derivadas del cordón umbilical que pudieran ser utilizadas en el futuro como elementos celulares aptos para las técnicas de medicina regenerativa que puedan desarrollarse.

Metodología

Tras el parto y la consiguiente revisión clínica del cordón, y una vez separada la sangre que este contiene, una muestra del tejido del cordón umbilical será almacenada para el proyecto. Las muestras del cordón umbilical serán enviadas al Centro de Investigación Biomédica donde se realizará el proceso de obtención de células madre multipotenciales (MAPCs).

Una alícuota de esas células se conservará en el CIBM y otras serán utilizadas para estudiar sus posibilidades de diferenciación a cartílago (condrocitos), vasos (endoteliales), hueso (osteocitos), hígado (hepatocitos), sistema nervioso (neuronas), piel (epidermoides y fibroblastos) y vasos (epiteliales). En el futuro, estas muestras podrán ser utilizadas en otros proyectos científicos siempre que los proyectos hayan sido debidamente aprobados por los Comités éticos correspondientes de los Hospitales que participen.

Además, con el empleo de un dispositivo mecánico (bioreactor) pretendemos mejorar los procedimientos de cultivo de las células MSCs para hacer el proceso más dependiente de la tecnología que de la técnica y, concomitantemente, reducir el tiempo de laboratorio requerido para disponer del número de células necesario para que puedan practicarse los procedimientos de terapia celular que, probablemente, serán de enorme utilidad en las

aplicaciones de la medicina regenerativa y la terapia celular del futuro.

Beneficios esperados

Para el recién nacido ni para los padres del recién nacido la participación en este proyecto no implica un beneficio inmediato. Podrían existir beneficios científicos, para la comunidad, y para diversos tipos de pacientes, en el futuro.

Posibles efectos adversos

Su participación en el proyecto no le ocasionará ningún riesgo.

Participación voluntaria

Su participación en el proyecto será completamente voluntaria, existiendo la posibilidad de solicitar la retirada del mismo en cualquier momento sin que por ello se altere la relación con el grupo de profesionales que se ocupa de su asistencia.

Protección de los datos

La información contenida en su historial médico será específicamente codificada en la base de datos central con el objeto de mantener la confidencialidad y el anonimato de su identidad y la de su hijo/a. Sólo el personal médico autorizado que participa en el estudio tendrá acceso y podrá utilizar esta información.

Compensación económica

No existe compensación económica por su participación en este proyecto, ésta tiene un carácter exclusivamente voluntario. No existe ningún tipo de seguro proporcionado por el proyecto.

Donación

Donación significa que la sangre y el cordón umbilical de su bebé se almacenan en un banco de sangre público y se le puede ofrecer a cualquier persona que la necesite para un trasplante.

Personal de contacto

En caso de duda o de cualquier problema puede contactar con su médico en la dirección que se indica:

Doctor: ALBERTO PUERTAS PRIETO
Hospital: VIRGEN DE LAS NIEVES
Dirección: Avenida de las Fuerzas Armadas
Teléfono: 958020431

Hoja de aceptación de Participación

He sido informado adecuadamente sobre el proyecto de investigación y he tenido tiempo suficiente para considerar mi participación. Todos mis derechos me han sido explicados claramente. Mi participación es completamente voluntaria y tengo la posibilidad de retirar mi consentimiento en cualquier momento sin explicación alguna. Este hecho no afectará a la relación con mi médico.

He recibido una copia de las hojas de información sobre el ensayo y acepto a participar en el PROYECTO: “Cultivo extensivo de células stem pluripotenciales adultas, obtenidas a partir de cordón umbilical humano, en un bioreactor”

Todo el material y los datos se mantendrán confidenciales y codificados.

Mi consentimiento no libera a los investigadores de sus responsabilidades y yo mantengo todos mis derechos garantizados por la ley.

NOMBRE DEL PACIENTE:
DNI: FECHA:
FIRMA:

Persona designada por el investigador para participar en el proceso de consentimiento informado:

NOMBRE:
DNI: FECHA:
FIRMA:

NOMBRE DEL INVESTIGADOR:
DNI: FECHA:
FIRMA:

Publicaciones

V. de Araujo Farias y col. “Tela de Carbón activo: biomateriales para la proliferación y diferenciación de células mesenquimales”. En: *Boletín Español del Carbón*. pendiente de publicar

J. Gómez-Millán y col. “The importance of bystander effects in radiation therapy in melanoma skin-cancer cells and umbilical-cord stromal stem cells.” eng. En: *Radiother Oncol* (dic. de 2011). DOI: 10.1016/j.radonc.2011.11.002

V. A. Farias y col. “Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties.” En: *Placenta* 32.1 (ene. de 2011), págs. 86-95. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.11.003

J. L. Peñalver y col. “Activated carbon cloth as support for mesenchymal stem cell growth and differentiation to osteocytes”. En: *Carbon* 47.15 (dic. de 2009), págs. 3574-3577. DOI: 10.1016/j.carbon.2009.08.016

Tela de Carbón activo: biomateriales para la proliferación y diferenciación de células mesenquimales

V. de Araujo Farias^{1,5}, J.J. López Peñalver^{1,4,5}, J.L. Linares^{1,5}, M.V. López-Ramón², F.J. Oliver³, C. Moreno-Castilla⁴, J.M. Ruiz de Almodóvar^{1,5}

¹Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, España.

²Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, España.

³Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, 18100, Armilla, Granada, España.

⁴Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Granada, 18071 Granada, España.

⁵Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, IBIMER, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, España.

Palabras claves: Tela de carbón activado, biomateriales y células madre.

1. Introducción

El desarrollo creciente de la ingeniería tisular, así como los diversos procedimientos clínicos de terapia celular están estrechamente ligados a la búsqueda de nuevos biomateriales que faciliten:

- i) La consecución de líneas celulares capaces de proliferar indefinidamente y diferenciarse a diversos tipos de tejidos,
- ii) La expansión de esas células hasta alcanzar densidades de $1\text{-}5 \cdot 10^6$ células por kg de peso del paciente [1], y
- iii) La regeneración de tejidos dañados [2-4].

Las estructuras tridimensionales de los biomateriales proporcionan el soporte adecuado para que las células se adhieran, proliferen e, incluso, se diferencien cuando se les suministran los factores de crecimiento y diferenciación apropiados.

Diversos estudios se han centrado en el desarrollo de estructuras tridimensionales “scaffolds” a partir de los compuestos biológicos naturales existentes en el hueso o en la matriz extracelular [2, 3, 5-7] que, además de proporcionar un soporte de fijación para las células, suministran a éstas un microambiente similar al de los tejidos naturales, al actuar como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento [7] y facilitar la interacción de las moléculas señalizadoras con los receptores de la superficie celular [6, 8]. Por otra parte se ha descrito que los biomateriales basados en macromoléculas pueden afectar a las capacidades celulares de fijación, migración, proliferación y diferenciación [9]. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevos biomateriales entre los que se encuentran los nanotubos de carbono [10, 11] y las fibras de carbón activo [12], ya que estos son materiales biocompatibles sobre los que las células pueden adherirse y proliferar. La adhesión de las células vivas sobre el carbón activo incluye, en primera aproximación, un fenómeno de adsorción que tiene lugar entre la superficie del carbón y las macromoléculas que conforman la estructura de la membrana celular (entre ellas los antígenos de membrana). La adsorción puede explicarse mediante la teoría de la química de los coloides y las superficies, que incluye tanto la atracción electrostática como la no-electrostática entre las que se encuentran las interacciones hidrófobas. Esta última depende de la hidrofobicidad de la superficie de interacción entre las células y el carbón. Cuanto mayor sea esta fuerza de atracción mejor será el enlace entre el

ARTICLE IN PRESS

Radiotherapy and Oncology xxx (2011) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Radiotherapy and Oncology

journal homepage: www.thegreenjournal.com



Original article

The importance of bystander effects in radiation therapy in melanoma skin-cancer cells and umbilical-cord stromal stem cells

Jaime Gómez-Millán^{b,1}, Iana Suly Santos Katz^{c,1}, Virgínea de Araujo Farias^a, Jose-Luis Linares-Fernández^a, Jesús López-Peñalver^a, Gustavo Ortiz-Ferrón^a, Carmen Ruiz-Ruiz^a, Francisco Javier Oliver^d, José Mariano Ruiz de Almodóvar^{a,e,*}

^a Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Universidad de Granada, Spain; ^b Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Unidad de Gestión Clínica de Oncología, Málaga, Spain; ^c Instituto Butantan, Centro de Pesquisa e Formação em Imunologia, São Paulo, Brazil; ^d Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra; and ^e Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2011
Received in revised form 2 November 2011
Accepted 2 November 2011
Available online xxxx

Keywords:

Melanoma cancer cells
Umbilical-cord stromal stem cells
Radiosensitivity
Radiation-induced bystander cell-death
Fractionation in the bystander effect

ABSTRACT

Purpose: To examine direct and bystander radiation-induced effects in normal umbilical-cord stromal stem cell (HCSSC) lines and in human cancer cells.

Materials and methods: The UCSSC lines used in this study were obtained in our laboratory. Two cell lines (UCSSC 35 and UCSSC 37) and two human melanoma skin-cancer cells (A375 and G361) were exposed to ionizing radiation to measure acute radiation-dosage cell-survival curves and radiation-induced bystander cell-death response.

Results: Normal cells, although extremely sensitive to ionizing radiation, were resistant to the bystander effect whilst tumor cells were sensitive to irradiated cell-conditioned media, showing a dose–response relationship that became saturated at relatively low doses.

We applied a biophysical model to describe bystander cell-death through the binding of a ligand to the cells. This model allowed us to calculate the maximum cell death (χ_{max}) produced by the bystander effect together with its association constant (K_{By}) in terms of dose equivalence (Gy). The values obtained for K_{By} in A375 and G361 cells were 0.23 and 0.29 Gy, respectively.

Conclusion: Our findings help to understand how anticancer therapy could have an additional decisive effect in that the response of sub-lethally hit tumor cells to damage might be required for therapy to be successful because the survival of cells communicating with irradiated cells is reduced.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. Radiotherapy and Oncology xxx (2011) xxx–xxx

Variation in the intrinsic radiosensitivity of both human-tumor and normal-tissue cells is already recognized, and these differences may be related to clinical curability and tolerance to treatment [1]. At present, choice of the appropriate dose for all patients is based on a balance between minimizing the incidence of severe normal-tissue complications and maximizing the probability of local control. Radiation is an unusual toxic agent in that the timing of tissue damage can vary widely from one patient to the next [2,3]. Radiotherapy is based on traditional radiobiological models, in which the effect of radiation on cells is assumed to result from a cascade of simultaneous or successive events that start with the initial damage to DNA. Radiation-induced lethal or potentially lethal damage to the DNA of cells can be explained by linear-quadratic models, which can also be used to describe the relationship between the total

isoeffective dose and dose per fraction in fractionated radiation therapy [4]. Based on these models, successful tumor control requires that all clonogenic cells receive a lethal dose. The initial radiation-induced damage to DNA [5] may be a biological indicator of the quantity of energy transferred to the DNA. Nevertheless, the late effects of radiation have still not been fully explained and thus a more general theory to describe the consequences of radiation therapy appears to be necessary [6]. A key consequence in cells is that direct damage occurs to the DNA within the nucleus, producing a range of lesions, of which DNA double-strand breaks (DSBs) play a vital role in determining whether they survive radiation exposure or not [7]. The presence of DNA damage in cells activates repair mechanisms as well as signal transduction pathways, leading to cell cycle arrest and apoptosis. The tumor suppressor protein p53 plays a key role in whether the cell cycle is arrested or apoptosis ensues after a genotoxic attack. Parp-1 participates in the p53 response following irradiation [8,9], but the cascade of events, including intra- and inter-cellular signaling involving free radicals, reactive oxygen species, cytokines or epigenetic changes, has still to be clarified and the results can vary

* Corresponding author. Address: Centro de Investigación Biomédica, IBIMER, Universidad de Granada, Avenida del Conocimiento, 18100 Armilla, Granada, Spain.
E-mail address: jmrdrar@ugr.es (J.M. Ruiz de Almodóvar).

¹ These authors contributed equally to this study.



Contents lists available at ScienceDirect

Placenta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/placenta

Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties

V.A. Farias^{a,3}, J.L. Linares-Fernández^{a,2,3,*}, J.L. Peñalver^{a,b}, J.A. Payá Colmenero^{a,c}, G.O. Ferrón^{a,d}, E.L. Duran^{a,e}, R.M. Fernández^{a,e}, E.G. Olivares^{a,e}, F. O'Valle^{a,f}, A. Puertas^g, F.J. Oliver^h, J.M. Ruiz de Almodóvar^{a,i,1,*}

^aInstituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^bUnidad de Radiología Experimental, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^cUnidad de Microscopía, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^dUnidad de Citometría, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^eUnidad de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^fDepartamento de Anatomía Patológica, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^gDepartamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

^hInstituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, Spain

ⁱHospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 4 November 2010

Keywords:

Mesenchymal stem cell
Hypoxia
Umbilical cord
Differentiation
Myofibroblast
Electron microscopy

ABSTRACT

Background: It has been demonstrated that human umbilical cord stromal stem cells (UCSSCs) are bio-equivalent to bone marrow mesenchymal stem cells. However, little is known about their tissue origin or *in vivo* functions, and data on their expansion properties are limited due to early senescence in the culture methods described to date.

Methods: UC sections and cultured UCSSCs were analyzed with a panel of 12 antibodies. UCSSCs were grown in low-FCS containing medium at 5% or 21% oxygen and were assayed for their clonogenic properties, karyotype stability, expression of specific cellular markers, and multi-lineage potential. UCSSC contractile properties were evaluated by using collagen gel contraction assays under cytokine stimulus. **Results:** Immunohistochemistry studies showed that the UCSSCs were derived from the Wharton's jelly and not from the vascular smooth muscle sheath of the blood vessels. UCSSC growth properties were increased in a 5% oxygen atmosphere in comparison to normoxic culture conditions. In both culture conditions, UCSSCs were CD14-, CD34-, and CD45-negative while expressing high levels of CD73, CD90 and CD105 and maintaining their differentiation potentialities. UCSSCs expressed alpha smooth muscle actin and behaved as functional myofibroblasts when cellular contraction was challenged with appropriate stimuli.

Conclusions: UCSSCs are mesenchymal stem cells that reside in the perivascular area of Wharton's jelly and are phenotypically and functionally related to myofibroblasts.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been isolated from umbilical cord (UC) blood [1,2], umbilical vein subendothelium [3], and Wharton's jelly, while efforts have been made to distinguish

between perivascular [4,5] and intervascular [6,7] areas of Wharton's jelly.

Human umbilical cord stromal stem cells (UCSSCs) are emerging as an interesting alternative to bone marrow-derived MSCs because: i) UCSSCs are obtained by non-invasive means; ii) they meet International Society of Cellular Therapy criteria [8]; iii) they have been successfully differentiated to adipocytes [6], chondrocytes [9], cardiomyocytes [10], skeletal myoblasts [7], and bone [6], hepatocyte-like [11,12], endothelial [13], and neuronal [6] cells; and, importantly, iv) they are not recognized by HLA mismatch lymphocytes and they mitigate alloreactivity in mixed lymphocyte cultures, suggesting that human UCSSCs will be tolerated in allogeneic transplantation [14–16].

* Corresponding authors. Centro de Investigación Biomédica, Avenida del Conocimiento s/n, 18 100 Armilla, Granada, Spain. Fax: +34 958 81 91 32.

E-mail addresses: joseluislinares@ugr.es (J.L. Linares-Fernández), jmrdar@ugr.es (J.M. Ruiz de Almodóvar).

¹ Tel.: +34 958 241000x20013.

² Tel.: +34 958 24 10 00x20009.

³ Both authors have contributed equally to this work.

CARBON 47 (2009) 3574–3584

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/carbon

Activated carbon cloth as support for mesenchymal stem cell growth and differentiation to osteocytes

Jesús López Peñalver ^a, Jose-Luis Linares-Fernández ^a, Virgínea de Araujo Fariás ^a,
 María Victoria López-Ramón ^b, Mohamed Tassi ^a, Francisco Javier Oliver ^c,
 Carlos Moreno-Castilla ^d, José Mariano Ruiz de Almodóvar ^{a,e,*}

^a Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, Spain

^b Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain

^c Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC 18100, Armilla, Granada, Spain

^d Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

^e Hospital San Cecilio, 18012 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2009

Accepted 10 August 2009

Available online 14 August 2009

ABSTRACT

Activated carbon cloth was shown to be a good support for the growth and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). By using this approach, we improved the cell culture procedure and reduced the laboratory time required to obtain a very large number of MSCs suitable for utilization or differentiation.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Stem cells vary widely but have two characteristic properties, regardless of the tissue from which they derive: they can produce other stem cells of the same type in an unlimited manner, and they can give rise to a specific cell lineage for tissue maintenance or repair [1]. Multipotential MSCs can originate a limited group of cell types, including chondrocytes, osteocytes, adipocytes, myocytes, and neurons. MSCs have been isolated from different compartments of the umbilical cord, among other tissues [2]. MSCs transplanted under the appropriate conditions give rise to three germinal layers and substantially contribute to all or at least most tissues after their injection into blastocytes [3].

In cell therapy, MSCs are isolated from the same patient or from a healthy donor, and a sufficient amount is grown in the laboratory for a dosage of $1\text{--}5 \times 10^6$ cells per kg of patient weight [4]. However, conventional culture of MSCs requires weekly passage, reducing their pluripotency and proliferation capacity because of exposure to enzymes (e.g., trypsin) that degrade cell surface proteins [5–7]. Majd et al. [6] recently

described a novel method for continuously increasing the culture surface at relatively constant cell densities, which can generate the large number of autologous and multipotent MSCs needed for successful regenerative medicine.

The use of activated carbon cloth (ACC), which presents a large surface area, may fulfill the space requirements and avoid weekly passaging. In addition, carbon-based materials are of interest because they are well accepted by the biological environment [8,9]. However, very little research has been reported on the interactions between stem cells and three-dimensional scaffolds [10]. Living cells are known to attach to the surface of activated carbon via adsorption [11], and this process can be explained by colloid and surface chemistry in terms of electrostatic and hydrophobic interactions. Electrostatic interactions are highly dependent on the solution pH, which affects the carbon surface charge and the dissociation or protonation of organic functional groups of the outer cell membrane. The strength of hydrophobic interactions is positively related to the hydrophobicity of the cells and the carbon

* Corresponding author. Address: Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, Spain. Fax: +34 958 819132.

E-mail address: jmrdar@ugr.es (J.M.R. de Almodóvar).
 0008-6223/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.carbon.2009.08.016

Presentaciones en congresos

V. de Araujo Farias y col. “The importance of bystander effects in melanoma skin-cancer cells and umbilical-cord stromal stem cells”. Inglés. En: *X Aporeunión*. Red española de apoptosis - APORED. 2011

J. J. López-Peñalver y col. “Telas de carbón activado como soporte para el crecimiento de células madre”. Spanish. En: *X Reunión del Grupo Español del Carbón*. Grupo Español del Carbón. 2010

V. de Araújo Farias y col. “Characterization of human umbilical cord matrix stem cells under improved culture conditions”. Inglés. En: *Vth Biennial Congress Spanish Society of Gene and Cell Therapy. Human Gene Therapy*. Vol. 37. Sociedad Española de Terapia Génica Y Celular. Granada: Mary Ann Liebert, Inc, 2009, págs. 1062-1062

Abreviaturas

- ACTA2* alfa actina de músculo liso. 51, 102
- ACTG2* gama actina de músculo liso. 51
- ALCAM* *activated leukocyte cell adhesion molecule*. 22
- ANPEP* *alanyl (membrane) aminopeptidase*. 19, 22
- CD14* molécula de CD14. 12, 19, 22, 101, 102
- CD19* molécula de CD19. 19
- CD33* molécula de CD33. 23, 25
- CD34* molécula de CD34. 12, 15, 19, 23, 25, 101, 102
- CD38* molécula de CD38. 23
- CD44* molécula de CD44. 22, 101
- CD68* molécula de CD68. 98
- CD79A* molécula de CD79A, *immunoglobulin-associated alpha*. 19
- ENG* endoglin. 12, 19, 21, 22, 101, 102
- FAS* *Fas (TNF receptor superfamily, member 6)*. 110
- GYPA* glicoforina A (grupo sanguíneo MNS). 23
- HLA-G* complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, G. 23
- ICAM1* molécula de adhesión celular 1. 24

- IL10* interleucina 10. 56, 82, 83, 103
- IL3RA* interleukin 3 receptor, alpha (low affinity). 23
- IL8* interleucina 8. 109
- ITGA2* integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor). 22
- ITGA3* integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor). 22
- ITGA4* integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor). 22
- ITGA5* integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide). 22
- ITGAM* integrina, alfa M (complement component 3 receptor 3 subunit). 19
- ITGAV* integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51). 22
- ITGB1* integrina, beta 1. 22, 101
- KIT* v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog. 12, 24
- KLF4* Kruppel-like factor 4 (gut). 20, 52, 80
- MCAM* melanoma cell adhesion molecule. 22
- MME* metalo-endopeptidasa de la membrana, conocida usualmente por CD10. 22, 98, 101
- MYC* v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian). 20, 52, 80
- NANOG* Nanog homeobox. 4, 11, 12, 14, 21, 22, 52, 80
- NCAM1* neural cell adhesion molecule 1. 23
- NT5E* 5'-nucleotidase, ecto. 12, 19, 21, 22, 101
- PECAM1* molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales. 23
- POU5F1* POU class 5 homeobox 1. 4, 11, 12, 14, 20, 21, 24, 52, 80
- PROM1* prominin 1. 23, 25
- PTPRC* protein tyrosine phosphatase, receptor type, C. 12, 19, 23, 101, 102
- SALL4* sal-like 4 (*Drosophila*). 52, 80

- SOX2** SRY (*sex determining region Y*)-box 2. 4, 11, 14, 20, 22, 52, 80
- TGFB1** factor de crecimiento transformante beta 1. 56, 82, 103, 109
- THY1** *Thy-1 cell surface antigen*. 12, 19, 21, 22, 101, 102
- TNF** factor de necrosis tumoral. 109, 110
- TRAIL** factor 10 de la superfamilia de factores relacionados con el factor de necrosis tumoral (TNFSF10), más conocido como TRAIL. 109, 110, 113
- VCAM1** molécula de adhesión celular vascular 1. 24
- ZFP42** *zinc finger protein 42 homolog (mouse)*. 14
- DMSO** dimetilsulfóxido (Sigma, D2650). 45
- DP** número acumulado de duplicaciones de población. 47, 100
- EGF** factor de crecimiento epidermal. 45, 100
- ESC** células madre embrionarias. 4, 8–11, 14, 21, 106
- FBS** suero bovino fetal. 44, 61
- GFP** proteína verde fluorescente. 59, 60, 83, 84
- HLA-DR** complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR. 19
- HSC** células madre hematopoyéticas. 4–6, 9, 15, 18, 101
- IBMX** 3-isobutil-1-metilxantina. 55
- ICM** masa interior de células o embrioblasto. 8
- iPSC** células madre pluripotenciales inducidas. 4, 9, 10, 20
- MAPC** células madre progenitoras adultas multipotenciales. 19, 20
- MC** medio condicionado por la irradiación. xx, 62–65, 91–95, 106–110, 112
- MSC** células madre mesenquimales. xvii, 9, 14, 15, 17–19, 21–29, 39, 100–102, 104, 106, 110

NSC células madre neurales. 9, 18

PBS tampón fosfato salino. 41, 42, 49, 51, 56, 63, 64

PDGF factor de crecimiento derivado de plaquetas. 45, 56, 82, 83, 103

PVD enfermedad vascular periférica. 20

SMA actina de músculo liso. 82

T_D tiempo de duplicación. 46, 47, 100

TCA tela de carbón activado. 26, 28, 29, 37, 38, 58–60, 83–86

tripsina solución de tripsina al 0,25% m/v (Gibco, 25200075). 42, 45

UCSSC células madre estromales de cordón umbilical. xvii–xx, 22–24, 44, 51, 54–61, 67–70, 72–74, 76, 77, 80–84, 86–90, 93, 97–106, 110, 113, 117