



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Departamento de Farmacología  
Programa de doctorado: 135E Farmacología

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES MESODÉRMICOS  
CON ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA EN EL TEJIDO ADIPOSEO HUMANO**

**TESIS DOCTORAL presentada por:**

Amparo Navarro Soriano

**Dirigida por:**

Dra. María Dolores Miñana Giménez

**Tutor:**

Dr. Julio Cortijo Gimeno

Valencia, Enero 2013





FUNDACIÓ  
INVESTIGACIÓ  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA

**María Dolores Miñana Giménez**

Licenciada en Cc. Químicas.

Doctora por la Universidad de Valencia

**INFORMA:**

Que Dña. Amparo Navarro Soriano, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES MESODÉRMICOS CON ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA EN EL TEJIDO ADIPOSO HUMANO"**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

En Valencia a 15 de Enero de 2013

---

María Dolores Miñana Giménez, PhD

19982872N



*A mi pequeño Álvaro y a Javi  
lo mejor de mi vida*



## ***AGRADECIMIENTOS***

En este apartado quiero dejar constancia de las personas que con su ayuda, afecto y apoyo han contribuido a que este trabajo se haya convertido en una realidad.

Para ser justos debo remontarme a mis inicios en el laboratorio de Farmacología, a Arantxa y Jose Luis, por acogerme con los brazos abiertos y darme su amistad, y a Maleles, a su lado aprendí muchísimo, y en cierto modo, se acabó convirtiendo en mi "hermana mayor".

A los compañeros de la Fundación de Investigación del Hospital General, por los buenos ratos que hemos pasado juntos, y el buen ambiente de trabajo. Gracias en especial a Susi, a Silvia y a Cristina, por su amistad y apoyo en estos años.

Al Dr. Severiano Marín, agradecerle su colaboración aportando las muestras de tejido adiposo con las que se ha llevado a cabo este trabajo.

A todas las chicas del laboratorio de Inmunohematología del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana, a Amparo, las dos Isas, y a Luisa, por su cariño y recibirnos siempre con una gran sonrisa, pero más especialmente a Casi Riol, por enseñarme tantas cosas y tratarme como a una hija, gran parte de este trabajo no habría sido posible sin su colaboración e inestimable ayuda; y por supuesto al Dr. Francisco Carbonell, por toda la citometría que he aprendido a su lado, ha sido todo un honor trabajar a con él.

Por último y más importante, a mi directora, María Dolores, por apostar por mí y darme la oportunidad de trabajar con ella, y por transmitirme su pasión por el conocimiento. Ella me ha enseñado lo que es la ciencia con mayúsculas. Nunca le podré agradecer lo suficiente el esfuerzo y la paciencia de soportarme durante tanto tiempo. Ella es el *alma mater* de este trabajo, sin ella, esta tesis jamás hubiera sido posible.

En el plano personal tengo que agradecer a mis amigas Noelia, Miriam, Laura, Vicky, María José, Paz y Diana, y a mi amigo Pablo, todos los buenos momentos que me han hecho pasar y sus ánimos, que no han faltado nunca. Sobretudo a mi amiga Celia, compañera de andanzas científicas desde primero de carrera, y que siempre creyó en mí y me dió animos para seguir adelante incluso desde los lugares más recónditos de Europa.

A mi familia, gracias por vuestra paciencia. A mis hermanas Cristina y Nieves y a mi hermano Rafa, por darme siempre vuestro cariño; y sobretudo a mis padres por confiar en mí. En especial a mi madre, por quererme como me ha querido y apoyarme incondicionalmente; y a mi padre, por poder contar contigo siempre, y ser mi referente de tesón, esfuerzo y sacrificio. Es todo un orgullo ser vuestra hija.

Por último y de manera muy especial agradecerle a Javi su paciencia, comprensión, apoyo y sinceridad en los buenos y en los malos momentos transcurridos a lo largo de este período de mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado.



*ÍNDICE*

ABREVIATURAS	13
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
1. Medicina Regenerativa. Definición y breve reseña histórica	19
2. Las células stem	21
2.1 Células stem embrionarias	21
2.2 Células stem de adulto	22
2.2.1. Célula stem hematopoyética	24
2.2.2. Célula stem mesenquimal	28
2.2.3. Origen de las MSC	30
2.2.4. Plasticidad de las células stem del adulto	31
2.2.5. Las MSC en medicina regenerativa	35
3. El tejido adiposo, una fuente rica en MSC	39
3.1 Aislamiento de células del estroma	39
3.2 Consideraciones sobre el tejido adiposo	39
3.3 FVE del tejido adiposo humano. Inmunofenotipo	41
3.4 Potencial terapéutico de las células de la FVE del tejido adiposo	42
3.5 Células angiogénicas en la FVE del tejido adiposo	43
3.6 Identificación de células hemangioblásticas en la FVE del tejido adiposo humano	45
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>III. METODOLOGÍA</b>	<b>51</b>
1. Obtención de la FVE del tejido adiposo humano	53

2. Selección celular inmunomagnética	54
2.1 Selecciones celulares de la FVE	56
2.2 Selección de progenitores hematopoyéticos CD34 <sup>+</sup> a partir de sangre de cordón umbilical/placenta y sangre periférica de donante adulto	58
3. Cultivos celulares	59
3.1 Cultivos clonogénicos	59
3.1.1. Análisis de las BFU-E	61
3.2 Cultivos en medio líquido	61
3.2.1. Cultivo de progenitores hematopoyéticos	61
3.2.2. Cultivo de células mesenquimales	62
4. Análisis por citometría de flujo	63
4.1 Análisis inmunofenotípico	64
4.2 Tinción de hemoglobinas	65
5. Análisis de la expresión génica	67
5.1 Extracción y cuantificación del ARN total	68
5.2 Reacción RT	68
5.3 PCR a tiempo real	69
5.4 Gel de agarosa	71
6. Ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i>	71
6.1 Preparación del implante celular	73
6.2 Procedimiento animal	73
7. Análisis inmunohistoquímico de los implantes	74
7.1 Inmunohistoquímica con anti-CD31	75
7.2 Inmunohistoquímica con anti-CD45 y anti-eNOS	75

8. Análisis estadístico	76
<b>IV. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL</b>	<b>77</b>
OBJETIVO 1: Caracterización inmunofenotípica de las células de la FVE del tejido adiposo humano	79
1.1 Rendimiento celular del proceso de digestión del tejido adiposo	79
1.2 Expresión de antígenos de membrana en las células de la FVE	80
1.3 Frecuencias de las diversas subpoblaciones celulares de la FVE 82	89
OBJETIVO 2: Determinación de la actividad hematopoyética in vitro de las distintas subpoblaciones celulares de la FVE del tejido adiposo humano	91
2.1 Estimación de la frecuencia de progenitores hematopoyéticos en las subpoblaciones celulares CD45 <sup>+</sup> y CD45 <sup>-</sup> de la FVE	91
2.2 Expansión de los progenitores hematopoyéticos contenidos en las subpoblaciones celulares CD45 <sup>+</sup> y CD45 <sup>-</sup> de la FVE	96
2.3 Determinación de la capacidad hematopoyética de las células CD34 <sup>+</sup> de la FVE	97
2.4 Distribución de la celularidad y la actividad hematopoyética en la FVE	106
OBJETIVO 3: Determinación de la expresión de los genes que codifican para factores de transcripción hematopoyéticos en las distintas subpoblaciones celulares de la FVE del tejido adiposo humano	109

3.1 Expresión de los genes implicados en el proceso de la hematopoyesis	109
<b>OBJETIVO 4: Determinación de la ontogenia de los progenitores eritroides contenidos en la FVE del tejido adiposo humano</b>	<b>119</b>
4.1 Ontogenia de la Eritropoyesis	119
4.2 Estudio de los progenitores eritroides	121
4.3 Análisis de la expresión de la hemoglobina	122
4.4 Análisis de la expresión de los genes de las globinas	130
<b>OBJETIVO 5: Determinación de la capacidad angiogénica de las subpoblaciones celulares de la FVE del tejido adiposo humano</b>	<b>137</b>
5.1 Análisis de las MSC	139
5.2 Las Células de la FVE estimulan la angiogénesis	140
5.3 Las células CD45 <sup>+</sup> de la FVE se incorporan en los vasos sanguíneos formados	146
5.4 Las células de la FVE estimulan la arteriogénesis	147
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>149</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>155</b>
<b>VII. APÉNDICE</b>	<b>179</b>

## ABREVIATURAS

7AAD: 7-aminoactinomicina D.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

APC: Aloficocianina.

APC-H7: Aloficocianina-análogo de la cianina 7.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

bFGF: *Basic fibroblast growth factor*. Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

BFU-E: *Burst-forming unit-erythroid*. Unidad formadora de brotes eritroides.

BSA: *Bovine serum albumin*. Seroalbúmina bovina.

CFU: *Colony-forming unit*. Unidad formadora de colonias.

CFU-E: *Colony forming unit-erythroid*. Unidad formadora de colonias eritroides.

CFU-GEMM: *Colony-forming unit of granulocytes, erythrocytes, monocytes/macrophages and megakaryocytes*. Unidad formadora de colonias granulocíticas, eritrocíticas, monocíticas y megacariocíticas.

CFU-GM: *colony-forming unit of granulocytes and monocytes/macrophages*).

Unidad formadora de colonias granulocitos y monocitos.

CFU-M: *Colony forming unit of macrophages*. Unidad formadora de colonias de macrófagos.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

EBM: *Endothelial basal medium*.

EDTA: Ácido etilendiamintetraacético.

EGF: *Epidermal growth factor*. Factor de crecimiento epidérmico.

EGM-2MV: *Endothelial growth medium-2 microvascular*.

#### Abreviaturas

- eNOS: *Endothelial nitric oxide synthase*. Enzima óxido nítrico sintasa endotelial.
- EPO: *Erythropoietin*. Eritropoyetina.
- FBS: *Fetal bovine serum*. Suero fetal bovino.
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
- FL/Flt-3: *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*. Ligando de la tirosin-kinasa 3, relacionada con Fms.
- FSC: *Forward Scatter*. Tamaño relativo.
- FVE: Fracción vascular estromal.
- GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
- G-CSF: *Granulocyte colony-stimulating factor*. Factor estimulante de colonias de granulocitos.
- GM-CSF: *Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*. Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.
- HbA: Hemoglobina adulta.
- HbF: Hemoglobina fetal.
- HRP: *Horserradish peroxidase*. Enzima peroxidasa de rábano.
- HSC: *Hematopoietic stem cell*. Célula troncal hematopoyética.
- IGF: *Insulin-like growth factor*. Factor de crecimiento semejante a la insulina.
- IgG: Inmunoglobulina G.
- IL-3: *Interleukin-3*. Interleucina-3.
- IL-6: *Interleukin-6*. Interleucina-6.
- LTC-IC: *Long-term culture-initiating cells*. Células iniciadoras de cultivo a largo plazo.
- LT-HSC: *Long term hematopoietic stem cell*. Célula troncal hematopoyética de largo plazo.
- MSC: *Mesenchymal stem cell/mesenchymal stromal cell*. Célula troncal mesenquimal/ célula estromal mesenquimal.
- NTC: *No template control*. Control negativo de la PCR.

PBS: *Phosphate Buffered Saline*. Tampón fosfato salino.

PE: Ficoeritrina.

PE-CY7: Ficoeritrina-cianina 7.

PerCP: Proteína peridinin clorofila.

PIGF: *Placental derived growth factor*. Factor de crecimiento placentario.

RT-PCR: *Real time polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

SCF: *Stem cell factor*. Factor de células troncales.

SCU: Sangre de cordón umbilical.

SP: Sangre periférica.

SSC: *Side scatter*. Complejidad/granularidad relativa.

Stem: Troncal.

ST-HSC: *Short term hematopoietic stem cell*. Célula troncal hematopoyética de corto plazo.

TAE: Tampón Tris-Acetato-EDTA.

TGF- $\beta$ : *Transforming growth factor- $\beta$* . Factor de crecimiento transformante- $\beta$ .

Threshold: Valor de umbral.

TPO: *Thrombopoietin*. Trombopoyetina.

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*. Factor de crecimiento de endotelio vascular.





## ***INTRODUCCIÓN***



## 1. MEDICINA REGENERATIVA. DEFINICIÓN Y BREVE RESEÑA HISTÓRICA

El término Medicina Regenerativa fue introducido por primera vez en 1992 por L. Kaiser en un manuscrito que trataba sobre el impacto de las futuras tecnologías en los hospitales [1], aunque fue William Haseltine quien popularizó este término. El Dr. Haseltine, fundó en 1992 la compañía “*Human Genome Sciences*”, la primera empresa que ha utilizado la medicina genómica para el diseño de medicinas basadas en los genes humanos. En marzo de 2000 fundó “*e-biomed: The Journal of Regenerative Medicine*” (ahora una revista discontinuada) y en diciembre del mismo año presidió la primera conferencia anual sobre Medicina Regenerativa, “*Regenerative Medicine: A Unique Approach to Healing*”.

Aunque en términos generales se puede definir la Medicina Regenerativa como el proceso de reemplazar o regenerar las células, tejidos u órganos para restaurar la función normal de los mismos, lo cierto es que aún no existe un consenso en su definición. Una de las definiciones que más se acercaría a dichos objetivos es la que proponen Daar y Greenwood: “La Medicina Regenerativa es un campo emergente interdisciplinario de investigación y de aplicaciones clínicas enfocadas a la reparación, reposición o regeneración de células, tejidos u órganos, para restaurar la función dañada resultante de cualquier causa, incluyendo los defectos congénitos, enfermedad, y trauma”. Utiliza una combinación de abordajes tecnológicos que van más allá del tradicional trasplante y terapias de reemplazo, y que incluyen: el uso de células troncales (stem), células progenitoras u otros tipos celulares (Terapia Celular); la inducción de la regeneración por moléculas biológicamente activas, administradas solas o como secreción de células infundidas (Terapia de Inmunomodulación) [2, 3]; y el trasplante de tejidos u órganos crecidos *in*

## Introducción

*vitro* (Ingeniería Genética y/o Ingeniería de Tejidos). Dentro de esta novedosa área, las terapias basadas en la utilización de células stem para la reparación y regeneración de diversos tejidos y órganos ofrecen un cambio de paradigma en la medicina actual, que podría proporcionar soluciones terapéuticas alternativas a un gran número de patologías intratables actualmente.

Sobre la base de estos conceptos, sería injusto no mencionar a E. Donnall Thomas, pionero en la realización de trasplantes de médula ósea [4, 5], lo que le valió el Premio Nobel en 1990. A mediados de los años 1970 se empezaron a realizar trasplantes de médula ósea en pacientes con anemia aplásica, y ya en 1980 y 1990 se extendió este tipo de terapia a pacientes con una amplia variedad de enfermedades malignas [6]. En la actualidad se utiliza el término “trasplante de progenitores hematopoyéticos”, en lugar de “trasplante de médula ósea”, pues son varias las fuentes utilizadas, médula ósea, sangre periférica movilizada y sangre de cordón umbilical/placenta (SCU).

Han pasado ya más de 50 años desde que los primeros experimentos realizados en ratones dieran pie a los primeros trasplantes en humanos [7]. El campo de los trasplantes de los progenitores hematopoyéticos ha sido el motor en los progresos realizados en la identificación y purificación de la célula troncal hematopoyética (HSC, *hematopoietic stem cell*), en el diseño de vectores virales y retrovirales que aumenten la eficiencia de la transferencia génica en las células stem y en el diseño de animales de experimentación inmunodeprimidos. Por todo ello, y aunque la Medicina Regenerativa, entendida como un concepto nuevo, empieza su andadura en los albores del año 2000,

se puede decir sin lugar a dudas que empezó a finales de 1960 y principios de 1970 [8-10].

## **2. LAS CÉLULAS STEM**

Una célula stem es una célula primitiva que tiene la capacidad de reproducirse (autorrenovación) y dar origen a células más especializadas (células diferenciadas). Se pueden considerar dos tipos de célula stem, las embrionarias y las de adulto. Con muy pocas excepciones, las células stem de tejidos fetales o adultos solo dan lugar a un limitado número de células diferenciadas. Estas limitaciones en el desarrollo son críticas para el mantenimiento de la integridad de los tejidos. Por el contrario las células stem embrionarias son por naturaleza mucho más versátiles.

### ***2.1. Células stem embrionarias***

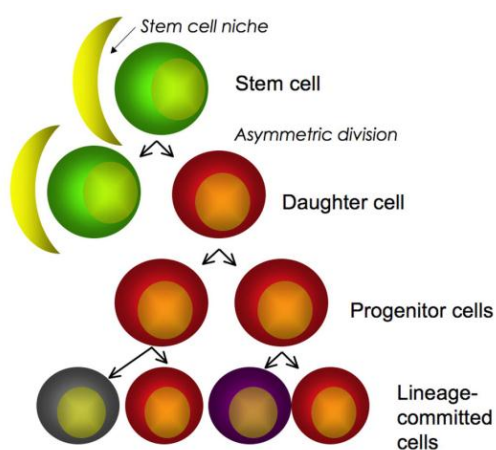
Las células stem embrionarias derivan de la masa celular interna del blastocisto y son capaces de generar todas las células diferenciadas de todos los tejidos del organismo, pero son incapaces de producir un nuevo individuo. Por ello, son pluripotentes y no totipotentes. Una célula totipotente sería aquella célula que puede dar origen a un nuevo individuo si se le suministra un soporte materno adecuado. En el caso del ratón, las células totipotentes persisten solo hasta el estadio de 8 células. Mantenido en las condiciones apropiadas, las células stem embrionarias son inmortales, pudiendo crecer de manera infinita y reteniendo su pluripotencialidad. Por ello se han convertido en herramientas poderosas para el estudio de muchos aspectos de la biología celular y por su potencial uso en terapia celular. Sin embargo, existen al menos tres retos significativos que deben superarse antes de que se puedan aplicar en la clínica: el primero es el de poder generar un número suficiente

## Introducción

del tipo celular deseado en forma pura; el segundo es entender qué tipo de células hay que suministrar y en qué forma hay que administrarlas; y por último es el de evitar su rechazo por el sistema inmune [11].

### 2.2. Células stem del adulto

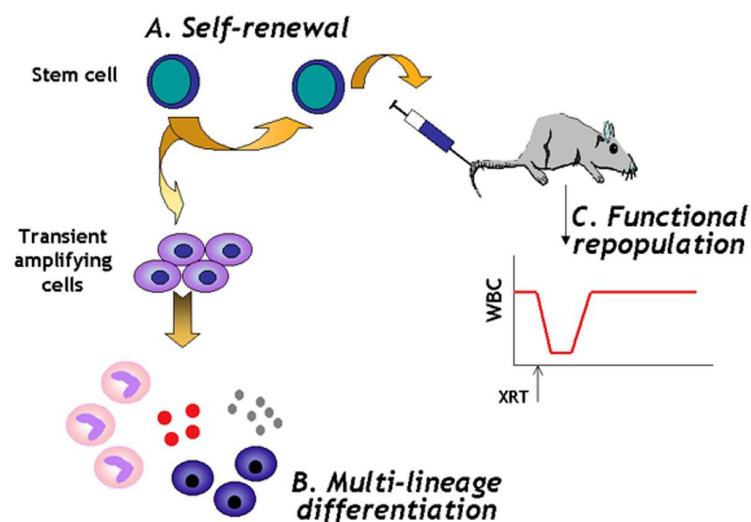
Las células stem embrionarias generan un segundo grupo de células, denominadas células stem específicas de órgano o de tejido. Estas células generan todos los tipos celulares que forman el tejido, y por ello son multipotentes (Figura 1). A diferencia de las embrionarias, tienen menor capacidad de autorrenovación, en parte debido a que no poseen tanta telomerasa [11].



**Figura 1. Modelo de división asimétrica de la célula stem.** En su nicho, la célula stem experimenta divisiones asimétricas que dan lugar a una nueva célula stem y a otra célula que al salir del nicho se divide produciendo células progenitoras, las cuales a lo largo de las múltiples divisiones celulares dan lugar a las células diferenciadas. Imagen tomada de Gordon J Stewler IBMS BoneKEy 2008;5308–322.

El prototipo de célula stem del adulto es la HSC. Está ampliamente aceptado que una célula stem debe cumplir cuatro requisitos: 1) capacidad de autorrenovación, necesaria para mantener la población stem; 2) capacidad de generar células hijas comprometidas en el proceso de diferenciación

(mantenimiento de la estirpe celular); 3) capacidad de repoblar y restaurar la funcionalidad del tejido de origen cuando se trasplantan en un huésped con dicho tejido dañado; y 4) contribuir al mantenimiento de la progenie diferenciada en el tejido de origen, aún en ausencia de daño (Figura 2).



**Figura 2. Definición de célula stem.** Imagen tomada de CM Verfaille. Hematology 2002. 2002:511-523.

Se han identificado muchas células stem en el adulto, siendo las más ampliamente estudiadas las hematopoyéticas, las neurales de las que derivan las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, y las mesenquimales que dan origen a las células que forman los tejidos mesodérmicos.

La biología de las células stem fue durante años un área de la ciencia bastante restringida. Baste recordar que el establecimiento de cultivos de células pluripotentes de ratón fue descrito en 1981 [12, 13]. Sin embargo, a raíz de la clonación de la oveja Dolly en 1997 [14] y el establecimiento de las líneas celulares embrionarias humanas en 1998 [15, 16], la investigación

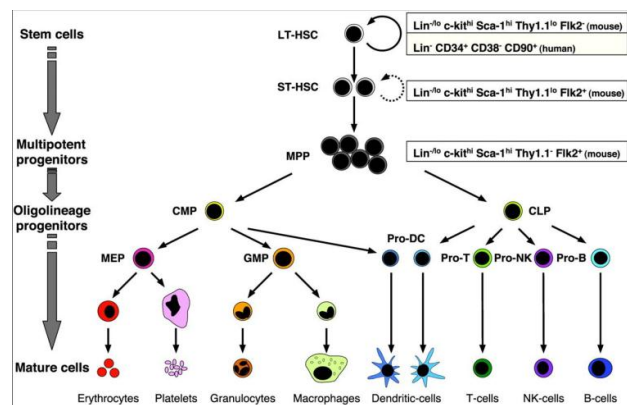
## Introducción

en células stem se ha convertido en tema de discusión, con implicaciones religiosas, éticas, políticas y económicas. Nunca en la historia de la investigación biomédica los descubrimientos científicos tuvieron tanta repercusión.

### 2.2.1. Célula stem hematopoyética

La HSC fue la primera célula stem identificada. Los ensayos realizados por J. Hill, E. McCullough y L. Siminovitch en 1963 [17, 18] aportaron evidencias de su existencia en la médula ósea, a la vez que demostraron su capacidad de autorrenovación y de diferenciación multilínea. Este descubrimiento marcó el inicio de la actual investigación en células stem.

La hematopoyesis es un proceso jerárquico iniciado por las HSC que, progresivamente, y a través de la generación de progenitores más comprometidos, finaliza con la generación de las células diferenciadas (Figura 3).



**Figura 3. Linaje hematopoyético.** Las HSC se pueden dividir en HSC de largo plazo (LT-HSC) y en HSC de corto plazo (ST-HSC), que se diferencian en progenitores multipotentes (MPP), los cuales a su vez se diferencian en progenitores mieloides (CMP) y linfocitos (CLP) que darán lugar a todas las células hematopoyéticas. Imagen tomada de Passegué E y cols. PNAS 2003; 100:11842-11849.



Aunque el concepto de HSC era ya conocido, la incorporación de la citometría de flujo ha sido vital para su identificación y aislamiento. En los ratones, las HSC se han purificado hasta casi la homogeneidad, y según la expresión de antígenos de membrana, la HSC expresa CD45, Thy1.1, cKit y Sca-1, no expresa antígenos de linaje (Lin) [19], y no tiene una elevada expresión de CD34 [20]. Además, se pueden purificar por su capacidad para excluir el Hoechst vía el transportador ABC Bcrp1 [21] y por ello, cuando se analizan por citometría de flujo, están presentes en la denominada "*side population*" [22].

En humanos, también se pueden utilizar los criterios de la "*side population*" para purificar las HSC [23]. Al igual que en ratón, las HSC son Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>, expresan c-kit y Thy1.1 y no expresan CD38, pero a diferencia de lo observado en ratón, la mayoría de las HSC están presentes en la subpoblación celular CD34<sup>+</sup> [24-26].

No obstante, hasta la fecha, las combinaciones de marcadores usados no permiten aislar poblaciones celulares discretas, pues en la mayoría de los casos la expresión de algún antígeno, como puede ser la del CD38 y la del CD90 suele ser bastante continua. Para determinar el contenido en HSC hay que realizar ensayos retrospectivos. El mejor ensayo *in vivo* requiere del uso de animales inmunodeprimidos letalmente irradiados. Solo aquellas células hematopoyéticas que sean capaces de restaurar la hematopoyesis serán HSC. A estas células se las llama unidades de repoblación competitiva (CRU, *competitive repopulating units*), o HSC de largo plazo (LT-HSC, *long-term HSC*). La mejor aproximación *in vitro* consiste en determinar las células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC, *long-term culture-initiating cells*), mediante ensayos de dilución límite. Para ello, las células en estudio

## Introducción

se cultivan sobre una monocapa celular capaz de sustentar la hematopoyesis. Todas aquellas células capaces de producir colonias hematopoyéticas transcurridas 6 semanas serán LTC-IC.

El modelo animal más ampliamente utilizado es el NOD/SCID (*non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*). Su uso ha permitido demostrar que en hígado fetal humano las HSC están contenidas en la "*side population*" y son CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> [27]. Más recientemente, usando el NOD/SCID/IL-2R<sup>γ</sup> null strain (NOG), que exhibe mayor capacidad de injerto para las HSC humanas, el grupo de Weissman [28] ha demostrado que las HSC están contenidas en la subpoblación celular Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>, mientras que los progenitores multipotentes estarían contenidos en la subpoblación celular Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>.

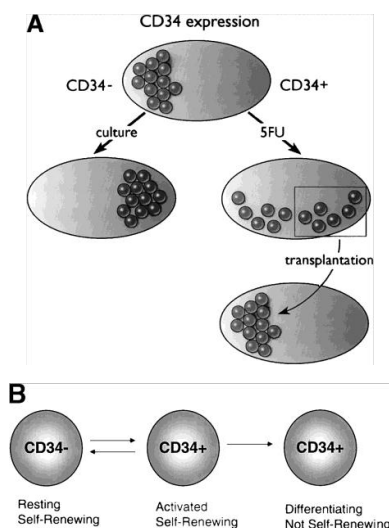
Los progenitores hematopoyéticos multipotentes, capaces de producir toda la estirpe mieloide, eritroide y linfoide y que tienen la capacidad de restaurar la hematopoyesis a corto plazo se denominan HSC de corto plazo (ST-HSC, *short-term HSC*), y se determinan como Unidades Formadoras de Colonias (CFU, *colony-forming units*). Para ello, las células de interés se siembran en un medio semisólido enriquecido en citocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos, que permiten la generación de las colonias hematopoyéticas. Transcurridas 2-3 semanas, se determina el número de progenitores hematopoyéticos.

En humanos, la población celular CD34<sup>+</sup> parece ser la responsable de la actividad hematopoyética de la médula ósea, incluyendo las ST-HSC, las LT-HSC, y determinadas subpoblaciones celulares hematopoyéticas en expansión.

Sin embargo, hay trabajos que demuestran que algunos progenitores muy primitivos que no expresan el CD34 son capaces de generar HSC CD34<sup>+</sup>.

Sato y cols. [29] demostraron, en un elegante trabajo, usando médula ósea de ratón y ratones a los que se les había administrado 5-fluoruracilo, que la actividad hematopoyética residía tanto en las células CD34<sup>+</sup> como en las CD34<sup>-</sup>. Dado que el 5-fluoracilo es tóxico para las células en división, depleciona los progenitores hematopoyéticos comprometidos y facilita la entrada en ciclo de las HSC quiescentes, los autores sugirieron que se puede inducir la expresión del antígeno CD34 en las HSC quiescentes en respuesta a las señales de proliferación. Además, demostraron que algunas de las células CD34<sup>+</sup> cambiaron a un fenotipo CD34<sup>-</sup> tras ser trasplantadas. Por ello, es posible que el CD34 sea un marcador de HSC activada, pero no de todas las HSC (Figura 4). Sin embargo, en humanos los resultados obtenidos son un tanto contradictorios, pues si bien hay grupos que han demostrado la existencia de HSC CD34<sup>-</sup> [23, 30, 31], otros no han detectado actividad hematopoyética en las células CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> de hígado fetal [27]. Más recientemente, Ciraci y cols. [32] han demostrado que las células Lin<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup> no tienen actividad hematopoyética *in vivo*, pero si pueden reconstituir la hematopoyesis y generar células endoteliales en ratones NOD/SCID, después de ser co-cultivadas durante 6 semanas sobre un estroma que soporta la hematopoyesis.

## Introducción

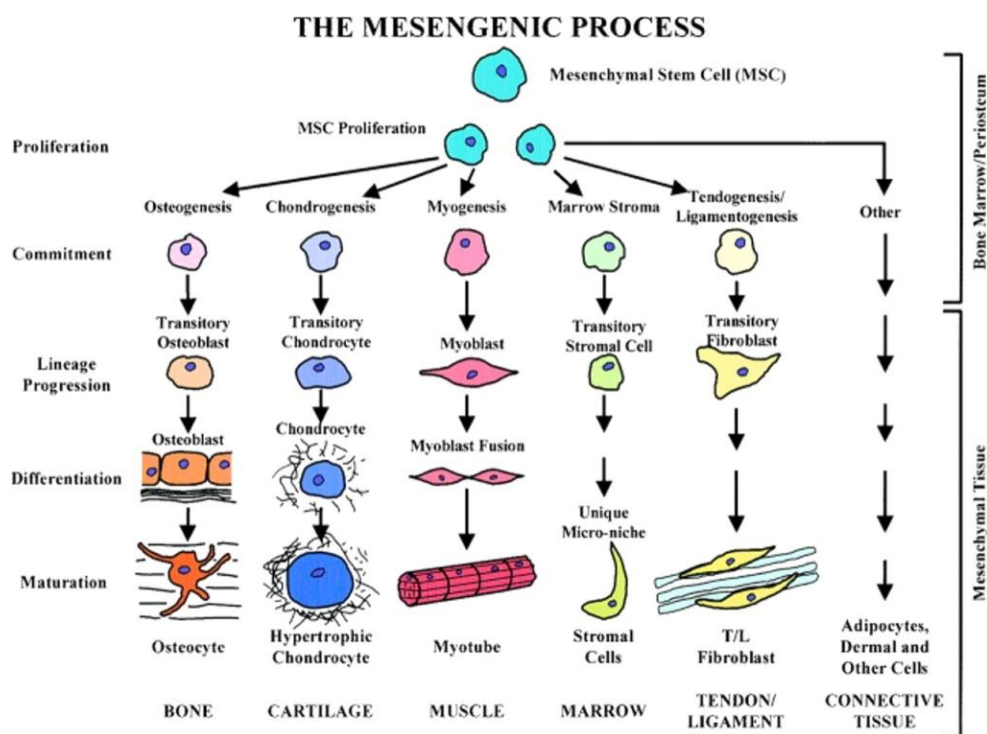


**Figura 4. Modelo propuesto para la expresión del antígeno CD34 en las HSC de la médula ósea.** Imagen tomada de Goodell MA. Blood 1999; 94:2545-2547, basada en las conclusiones de Sato y cols. Blood 1999;94:2548.

### 2.2.2. Célula stem mesenquimal

El término célula troncal mesenquimal (MSC, *mesenchymal stem cell*) hace referencia a las células progenitoras mesenquimales del adulto con el potencial para producir una progenie, que se diferenciará a su vez para dar origen a una variedad de células de estirpe mesodérmica, que forman los tejidos mesenquimales. La presencia de células progenitoras mesenquimales en la médula ósea aparece ya documentada a finales del siglo XIX en los trabajos de Goujon y Biakow. Estos autores fueron los primeros en demostrar el potencial osteogénico de las mismas en trasplantes heterotópicos de médula de conejo. Ya en la década de 1960, varios grupos (Danis, Petrakova y cols., y Friedenstein y cols.) demostraron que la médula ósea tenía capacidad para formar hueso y cartílago. En 1973 el grupo de Friedenstein demostró que el potencial osteogénico de la médula ósea era una propiedad de unas pocas células a las que llamó Unidades Formadoras de Colonias de

fibroblastos (CFU-f, *colony forming units of fibroblasts*). Años más tarde este grupo demostró que las CFU-f generaban el microentorno hematopoyético. La primera prueba de la existencia de una célula stem en la médula ósea fue presentada por Owen en 1978. Este autor propuso un modelo para el linaje estromal que incluía las células stem, los progenitores comprometidos y las células ya diferenciadas como las reticulares, los fibroblastos, los adipocitos y las células con potencial osteogénico [33]. Finalmente, en 1991 Caplan [34] propuso la existencia de una MSC con capacidad para diferenciarse en múltiples fenotipos mesenquimales (Figura 5).



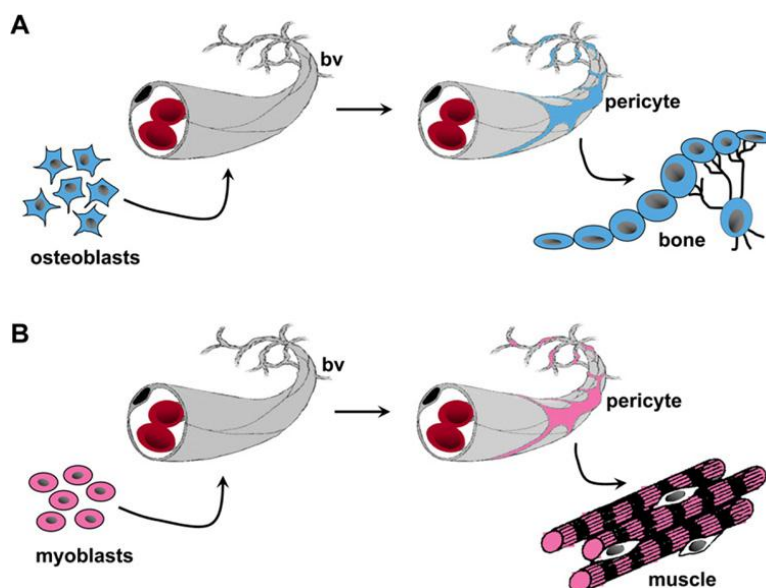
**Figura 5: Capacidad multilinaje de las MSC.** Imagen tomada de Caplan AI, Dennis JE. J Exp Med 2000;191:1-4.

### **2.2.3. Origen de las MSC**

El término MSC está basado en la hipótesis de que los tejidos de origen mesodérmico podrían estar formados por MSC postnatales. Sin embargo, y aunque los ensayos de dilución límite o el uso de CFU-f han demostrado la multipotencialidad de las MSC de médula ósea [33, 35, 36], el potencial no-esquelético de una única MSC no ha sido demostrado *in vivo*. Además, durante la organogénesis prenatal aquellos tejidos que en principio podrían estar relacionados con el linaje de las MSC, se forman a partir de progenitores distintos, y no a partir de un ancestro común. En la actualidad, aspectos tales como el origen de las MSC residentes en la médula ósea, la existencia de una población homogénea de MSC en los tejidos derivados del mesoderma, y el establecimiento de un linaje celular a partir de las MSC, tal como ocurre con las HSC siguen suscitando una gran controversia.

Se postulan varios mecanismos para la llegada de las MSC a la naciente médula ósea en la etapa prenatal: 1) las MSC llegan al hueso en desarrollo en el momento de la formación de la vasculatura; 2) migran al espacio después de la vascularización, aprovechando la trayectoria de los vasos, es decir, desde el periostio; y 3) llegan junto con la propia sangre, lo que justificaría la existencia de MSC en la circulación.

Los dos primeros mecanismos postulan la hipótesis de que las MSC podrían tener su origen en los pericitos. Los pericitos del periostio están en la región anatómica correcta para la migración de las MSC, están íntimamente asociados a los capilares, expresan marcadores de músculo liso y se pueden diferenciar en osteoblastos, células de músculo liso, adipocitos y condrocitos. En este modelo (Figura 6), las MSC y los pericitos formarían parte de un linaje celular del músculo liso de la vasculatura [33, 35, 37].

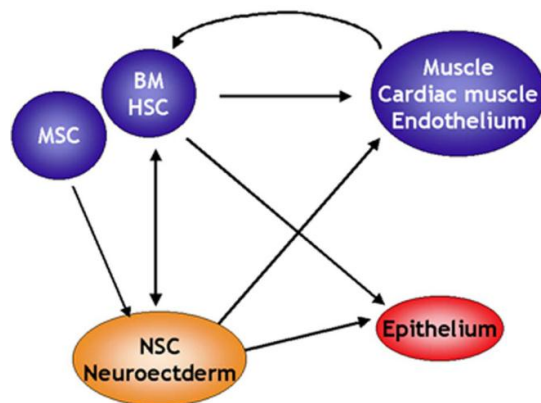


**Figura 6. Modelo propuesto para demostrar que los pericitos pueden servir como reservorio de progenitores específicos de tejido.** A) Durante el desarrollo, los osteoblastos en la médula ósea se asocian con la pared vascular como pericitos. En la etapa postnatal estas células pueden actuar como progenitores clonogénicos esqueléticos. B) los vasos sanguíneos se asocian con los progenitores miogénicos en el músculo en desarrollo para convertirse en pericitos. En el adulto, los pericitos aislados de la microvasculatura del músculo esquelético pueden exhibir potencial miogénico. Imagen tomada de Bianco y cols. Cell Stem Cell 2008;2(4):313–319.

#### **2.2.4. Plasticidad de las células stem del adulto**

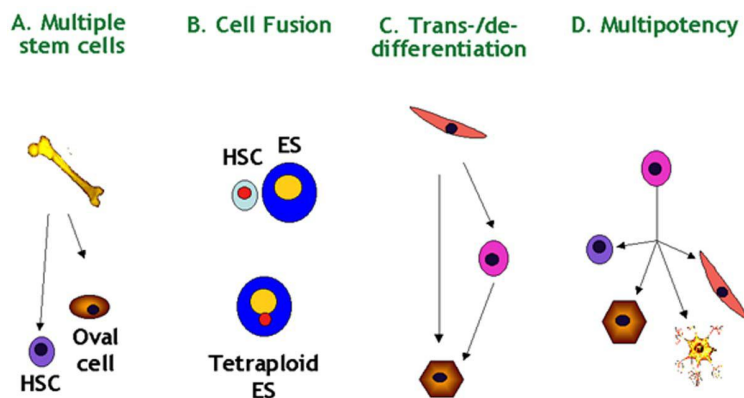
Las células stem embrionarias retienen cierto grado de plasticidad, es decir, la capacidad de transdiferenciarse o desdiferenciarse y rediferenciarse en células de otras capas germinales. Sin embargo, hay varios estudios en la literatura que sugieren que la plasticidad de las células stem del adulto (Figura 7) puede ser un fenómeno más común de lo que se había pensado inicialmente.

Introducción



**Figura 7. Plasticidad de la célula stem.** Imagen tomada de Verfaillie CM. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2002:369–391.

Varios son los mecanismos (Figura 8) que pueden explicar la aparente plasticidad: 1) múltiples células stem específicas de tejido están presentes en diferentes órganos; 2) la plasticidad es el resultado de la fusión entre la célula huésped y la del donante; 3) las células sufren un proceso desdiferenciación y rediferenciación y 4) existen en realidad células stem de adulto pluripotentes en la vida postnatal [8, 33, 35, 37].



**Figura 8. Mecanismos propuestos para la plasticidad de las células stem.** Imagen tomada de Verfaillie CM. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2002:369–391.

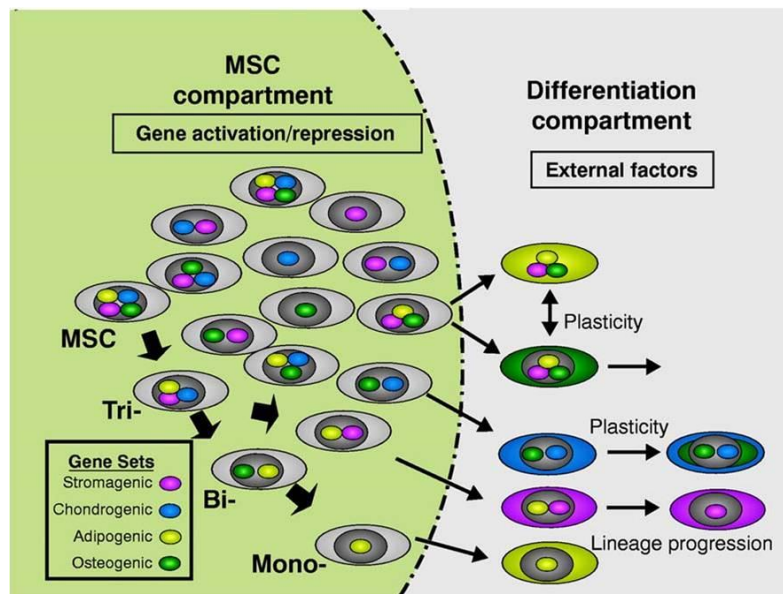


Es un hecho conocido que las HSC salen de su nicho medular, entran en la circulación y pueden anidar en diferentes órganos, por lo tanto las HSC podrían encontrarse en otros tejidos. Un ejemplo de ello lo constituyen los experimentos llevados a cabo por el grupo de M. Goodell. Estos autores describieron que la población celular "*side population*" del músculo poseía actividad hematopoyética [38], pero más tarde demostraron que dicha actividad derivaba en realidad de la médula ósea y no del músculo [39,40]. Otros grupos demostraron que las células de la médula ósea se diferenciaban en células de origen neural [41, 42], en hepatocitos [43] o contribuían a la formación de quimeras de hepatocitos y células endoteliales en los sinusoides hepáticos [44]. En muchos de los trabajos se utilizó médula ósea como fuente de HSC, pero se sabe que la médula ósea está compuesta por HSC, progenitores endoteliales y una variedad de células entre las que se incluyen las MSC, que conforman el estroma que actúa como nicho de las HSC, por lo que no se puede descartar que también existan otros progenitores, responsables de la plasticidad observada.

Un hecho que distingue el linaje de las MSC del de las HSC es que las vías de diferenciación no están estrictamente delineadas, ya que aparentemente, células completamente diferenciadas de una estirpe concreta tienen el potencial para convertirse en células de otra estirpe. El modelo estocástico de represión/inducción propuesto por Dennis y Charbord [45] podría explicar tal plasticidad (Figura 9). Los autores proponen que las MSC están caracterizadas por un estado molecular basal con potencial para la diferenciación, que podría surgir de una serie de eventos durante el desarrollo (metilación del ADN, modificaciones en la cromatina, etc), que a su vez silenciarían los genes, dando como resultado una colección de células stem con un número diferente de genes (estromagénicos, osteogénicos,

## Introducción

condrogénicos y adipogénicos) no silenciados y disponibles para la activación. Según este modelo, los eventos genéticos, que incluyen los factores de transcripción, serían más importantes en el compartimento de las MSC, mientras que los factores externos (hormonas, citocinas, moléculas de adhesión, etc) serían los que regularían el cambio entre linajes.



**Figura 9. Modelo estocástico de represión/inducción para las MSC.** La presencia de un grupo de genes “Gene Set” en el núcleo indica el potencial para expresar ese fenotipo. Los colores del citoplasma reflejan la expresión del fenotipo de los diferentes linajes. Un citoplasma con varios colores indica un fenotipo intermedio. Imagen tomada de Dennis JE, Charbord P. Stem Cells 2002;20:205-214.

Por último hay evidencias que apoyan la hipótesis de que las células stem pueden persistir en el adulto, después de la embriogénesis. Así, distintos grupos han identificado células stem o progenitoras en el hígado [46-48], y Suzuki y cols. [49], aislando células de hígado fetal y expandiéndolas a nivel clonal, demostraron que podían reconstituir el hígado, el epitelio biliar, el del páncreas y el del tracto gastrointestinal. También se ha demostrado la

existencia de células stem cardíacas que pueden regenerar el miocardio [50]. Por otra parte, el grupo de Verfaillie [51] demostró que las células denominadas células progenitoras multipotentes del adulto (MAPC, *multipotent adult stem cells*), que se purificaban con las MSC de la médula ósea, podían a nivel celular, diferenciarse *in vitro* en células de estirpe mesodérmica, endodérmica y ectodérmica.

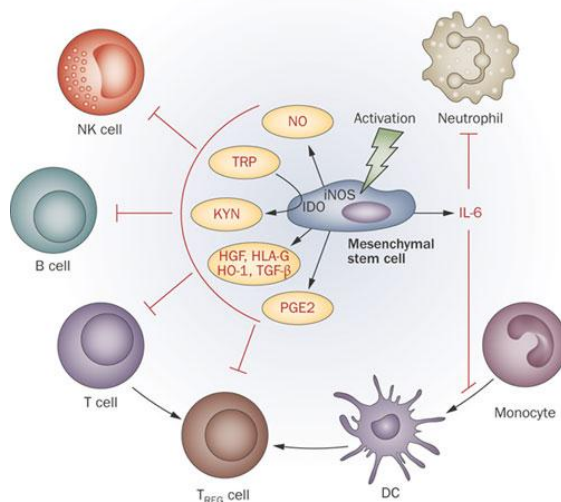
### **2.2.5. Las MSC en Medicina Regenerativa**

La demostración de que las MSC de médula ósea se injertaban en varios tejidos no hematopoyéticos tales como el hueso, cartílago y pulmón de ratones letalmente irradiados [52], y que se diferenciaban en osteoblastos competentes para la producción de la matriz ósea [53], suscitó de inmediato su uso terapéutico. La primera aplicación terapéutica de las MSC se llevó a cabo en niños con osteogénesis imperfecta. Tras el trasplante de las MSC, se observó una reducción en la frecuencia de fracturas óseas [54]. En la actualidad las MSC se están investigando para su aplicación en ingeniería de tejidos, particularmente para reparación de tejido esquelético [55].

Un hecho de gran trascendencia clínica fue el aportado por Caplan y cols. Estos autores demostraron que las MSC de médula ósea co-trasplantadas con HSC permitían una rápida recuperación de la hematopoyesis en pacientes con cáncer de mama avanzado [57]. Poco después se demostraría que las MSC trasplantadas anidaban en la médula [56] y facilitaban el injerto de las HSC [58]. En la actualidad las MSC están empezando a ser utilizadas para mejorar el prendimiento de las HSC en los trasplantes de progenitores hematopoyéticos.

## Introducción

Más recientemente, se ha demostrado que las MSC tienen propiedades inmunosupresoras [59], habiéndose identificado varios mediadores cuya señalización conduce a la inhibición de la proliferación de los linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , de los linfocitos B y las NK, y a la generación de linfocitos T reguladores (Figura 10) [60]. Sin embargo, se ha demostrado en modelos animales, que la inmunosupresión sistémica puede favorecer el crecimiento del tumor [61]. Estas propiedades inmunomoduladoras son la base de la utilización de las MSC para reducir la incidencia de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos [62], para el tratamiento de la EICH refractaria a la terapia inmunosupresora convencional [63], y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes [64, 65].



**Figura 10: Efecto inmunosupresor de las MSC.** Tras la activación, las MSC inhiben la proliferación de linfocitos B, T y NK. La secreción de IL-6 estaría implicada en la inhibición de los neutrófilos, así como en la inhibición de la maduración de las células dendríticas (DC). Las DC inmaduras inducirían la formación de células Treg, generando por tanto un nicho inmunomodulador o permisivo. Imagen tomada de Djouad, F. y cols. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2009;5:392–399.

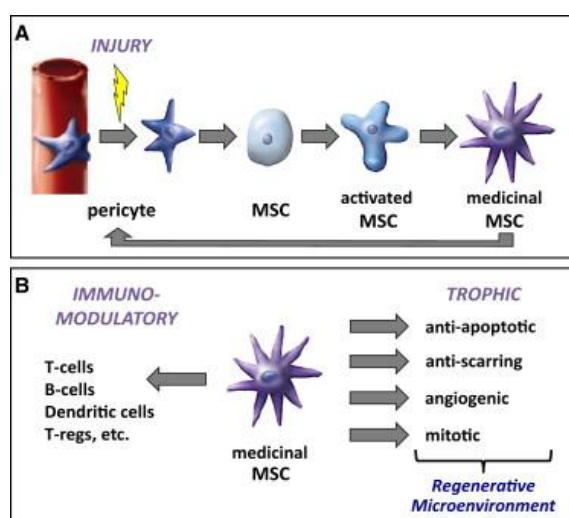
De todas las aplicaciones terapéuticas de las MSC, quizás sea la angiogénesis terapéutica una de las más estudiadas, probablemente porque la enfermedad cardiovascular sigue siendo la primera causa de muerte en los países industrializados. Aunque en muchos de los ensayos clínicos realizados se han observado efectos beneficiosos, los estudios realizados con animales de experimentación han demostrado que son muy pocas las células que permanecen en la zona infartada o isquémica [66], quizás por la falta de una señalización adecuada o porque el microentorno es demasiado hostil para su supervivencia, habiéndose sugerido que el beneficio obtenido está mediado por factores paracrinos [67]. Otra de las patologías vasculares en las que la terapia celular está siendo beneficiosa es la isquemia crítica de miembros inferiores [68].

Se han postulado varios mecanismos para explicar la bondad de las MSC: capacidad de secretar citocinas y factores de crecimiento que, además de favorecer la angiogénesis, estimularían el reclutamiento de células stem endógenas; aporte de antioxidantes, secuestradores de radicales libres y proteínas de choque térmico o chaperonas que facilitarían la eliminación de sustancias tóxicas y la recuperación de las células dañadas; posibilidad de ser trasplantadas como células diferenciadas; y por último su capacidad inmunosupresora (Figura 11).

Aunque en la actualidad son ya muchos los ensayos clínicos que se están realizando con MSC de médula ósea, y varias las empresas que están comercializando el producto final para trasplante alogénico en muy diversas patologías [69], lo cierto es que la obtención de las MSC a partir de la médula ósea presenta ciertos problemas, como son el dolor, la morbilidad y un bajo rendimiento celular al final del proceso de extracción. Ello ha llevado

## Introducción

a muchos investigadores a la búsqueda de fuentes alternativas. En la actualidad se han aislado células de similares características a las MSC de médula ósea en músculo esquelético [70], tejido adiposo [71], cordón umbilical [72], pulpa dentaria [73], membrana sinovial [74], sistema circulatorio [75] y líquido amniótico [76], entre otros. La lista excede a más de 30 órganos.



**Figura 11: Efecto inmunomodulador y trófico de las MSC.** A) Activación secuencial de los pericitos en respuesta a un insulto. Tras la activación inmune las MSC activadas se comportan como “MSC medicinales” liberando factores y transformando el medio en un microentorno regenerativo. B) Las moléculas bioactivas secretadas por las MSC pueden ser inmunomoduladoras y también generadoras de un poderoso campo trófico. Imagen tomada de Caplan AI, and Correa D. Cell Stem Cell 2011;9:11-15.

Según Gimble y cols. [77] para que las células stem puedan ser utilizadas con fines médicos deben cumplir los siguientes criterios:

1. Encontrarse en cantidades muy abundantes (millones a billones de células)
2. Poderse obtener por procedimientos mínimamente invasivos.
3. Poderse diferenciar en múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible.

4. Poderse trasplantar en forma autóloga o alogénica.
5. Ser manipulables de acuerdo a las actuales Guías de Buena Práctica (GMP, *good manufacturing practice*).

### **3. EL TEJIDO ADIPOSO: UNA FUENTE RICA EN MSC**

#### ***3.1. Aislamiento de las células del estroma***

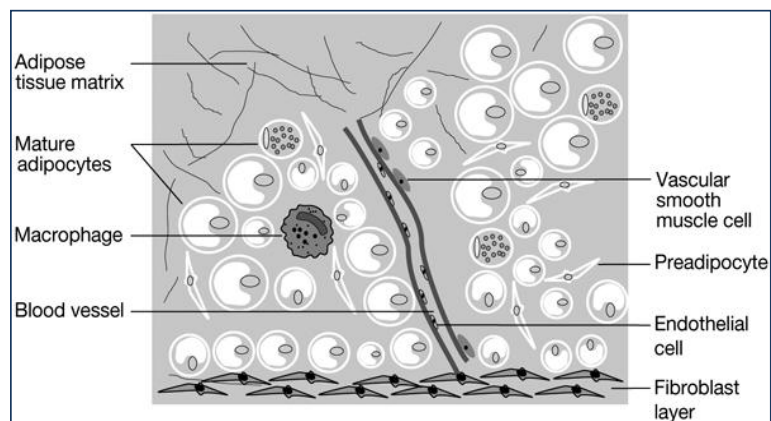
Los métodos iniciales para aislar las células del tejido adiposo fueron ya descritos en la década de 1960 [78, 79]. Los autores incubaron los fragmentos de tejido con colagenasa, centrifugaron para eliminar la población de adipocitos maduros y al botón celular resultante le llamaron fracción vascular estromal (FVE). Años más tarde, Zuk y cols. [71] demostraron por vez primera que las células adherentes de la FVE tenían capacidad de diferenciación multilineaje, y al igual que sucede con las MSC de médula ósea, los clones de células presentaban diferentes potenciales de diferenciación [80]. La disponibilidad del tejido, la facilidad de su obtención por procedimientos mínimamente invasivos y su alto contenido en MSC (la frecuencia de las MSC en las células nucleadas es 500 veces superior a la de la médula ósea), han convertido al tejido adiposo en una fuente de MSC, alternativa a la médula ósea [81].

#### ***3.2. Consideraciones sobre el tejido adiposo***

El tejido adiposo deriva del mesodermo. A nivel microscópico, ya se tiene evidencia de la presencia de adipocitos en el segundo trimestre de gestación [82]. Queda por demostrar si el origen de los progenitores adipogénicos se correlaciona con el de las células endoteliales, los pericitos o el compartimento estromal [83]. Macroscópicamente, se pueden distinguir 5 tipos diferentes de tejido adiposo con diferentes funciones biológicas: marrón o grasa parda (termogénico); mamario (aporta nutrientes durante la lactancia);

## Introducción

de soporte mecánico; de la médula ósea (ocupa el espacio que ya no tiene actividad hematopoyética y aporta citocinas para la actividad osteogénica y hematopoyética); y finalmente el tejido adiposo blanco, principal reservorio energético y el órgano endocrino más grande de todo el organismo, que secreta entre otras hormonas, adiponectina, leptina y resistina, además de citocinas y factores de crecimiento. Este tejido es uno de los más grandes y plásticos de todo el organismo y a lo largo de la vida del individuo pasa por periodos de expansión y contracción. Por ello, no es sorprendente que sea uno de los tejidos más vascularizados de todo el cuerpo. Existe una estrecha relación anatómica y fisiológica entre los vasos sanguíneos, las células perivasculares y los precursores de adipocitos (Figura 12). Al mismo tiempo, la vasculatura puede tener un papel causal en las funciones fisiológicas del tejido adiposo, controlando el número de microvasos y la remodelación de los vasos existentes. De hecho, se ha demostrado que la angiogénesis modula la adipogénesis y la obesidad [84].



**Figura 12: Dibujo esquemático de los componentes del tejido adiposo.** Imagen tomada de Schaffler A y cols. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005;2:103-111.



### **3.3. FVE del tejido adiposo. Inmunofenotipo**

La FVE está formada por una población de células muy heterogénea. Muchos grupos independientes han analizado la expresión de los antígenos de membrana de las células que componen la FVE, existiendo bastante uniformidad en los resultados [77]. Aunque en experimentación animal se ha utilizado el tejido adiposo marrón, el visceral y el subcutáneo, la práctica totalidad de los estudios realizados con tejido adiposo humano hacen referencia al tejido adiposo subcutáneo.

De los distintos marcadores de superficie usados para distinguir las poblaciones celulares contenidas en la FVE, uno de los más utilizados ha sido el CD31 y el HLA-DR, moléculas que también se expresan en las células endoteliales. Estas moléculas separan a las células de la FVE en dos subpoblaciones celulares: las células CD31<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, que no proliferan en las condiciones estándar de cultivo establecidas para las MSC, y las células CD31<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, que al cabo de unos pocos subcultivos se asemejan a las MSC de médula ósea. Los análisis de transcripción muestran que las células CD31<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> sobreexpresan transcritos asociados con el endotelio venoso y arterial, por lo que deben corresponder a células de la microvasculatura [85].

El perfil de expresión génica y de moléculas de superficie cambia notablemente entre las células recién aisladas y las células cultivadas. El cambio más notable es quizás la modulación de la expresión del antígeno CD34 que, de ser expresado en las células aisladas, se pierde a medida que progresa el cultivo [86]. Al cabo de dos pases sucesivos, las células adherentes de la FVE aparecen ya como una población celular homogénea que cumple los estándares propuestos por la "*International Society for Cell Therapy*" para definir las MSC. Es decir, son adherentes al plástico, tienen

## Introducción

potencial de diferenciación multilineaje y expresan el siguiente perfil antigénico: CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD11b/CD14<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, HLADR<sup>-</sup>, CD19/CD73b<sup>-</sup> [87]. Los análisis de proteómica han demostrado que el proteoma de las MSC derivadas del tejido adiposo es muy similar al de las MSC derivadas de médula ósea. Sin embargo, como ya había sido documentado por diferentes grupos, difieren en la expresión de CD34, CD31 y también de CD106 [88]. Por otro lado, los estudios con microarrays han demostrado que el transcriptoma de las células indiferenciadas de la médula ósea y el tejido adiposo es muy parecido. Ambos expresan genes asociados a célula stem como Oct4, Rex1 y Sox2 [89].

### **3.4. Potencial terapéutico de las células de la FVE del tejido adiposo**

El trasplante de tejido adiposo ha sido tema de estudio desde hace más de 100 años. Baste citar que ya en el año 1893 Neuber empleó tejido adiposo de los brazos para reconstruir las depresiones en la cara causadas por la tuberculosis. Actualmente, las MSC están siendo utilizadas con éxito en cirugía de reconstrucción de mama [90], y para cerrar fístulas asociadas con la enfermedad de Crohn [91]. Asimismo, hay diversos ensayos clínicos en marcha, para determinar su eficacia en lipodistrofias y otras enfermedades metabólicas [68, 92, 93]. Al igual que las MSC de médula ósea, pueden inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro* [94] y son inmunosupresoras *in vivo* [95], y por ello están siendo utilizadas para el tratamiento de patologías como la EICH, la enfermedad de Crohn, la artritis degenerativa o la esclerosis múltiple.

Aunque está ampliamente demostrado que las MSC derivadas del tejido adiposo tienen el mismo potencial de diferenciación multilineaje que las derivadas de médula ósea [96, 97] se ha sugerido que tienen mayor

capacidad de expansión y están más comprometidas hacia el linaje adipogénico, a diferencia de las de médula ósea, que estarían más comprometidas hacia una diferenciación osteo-condrogénica [96]. A pesar de ello, el desarrollo de nuevos biomateriales está permitiendo su utilización con éxito [98]. Quizás, uno de los casos más llamativos sea el documentado en el año 2004 en el que la combinación de MSC de tejido adiposo y un biomaterial degradable repararon con éxito las fracturas de la calota en una niña de 7 años [99].

### **3.5. Células angiogénicas en la FVE del tejido adiposo**

En el tejido adiposo los preadipocitos y las células endoteliales están íntimamente relacionados [100], por ello no es de extrañar que durante el proceso de digestión del tejido, se obtenga un número variable de células, cuyo fenotipo corresponde al de las células endoteliales,  $CD31^+HLA-DR^+$   $CD144^+$  y factor von Willebrand positivo [101-105]. Williams y cols. fueron pioneros en aislar estas células, y demostrar que podían ser utilizadas para mejorar la permeabilidad de los injertos vasculares sintéticos [106-108].

Por otra parte, varios grupos han demostrado la capacidad de las células de la FVE de diferenciarse hacia células endoteliales *in vitro*. Así, Planat-Benard y cols. [103] demostraron que las células  $CD13^+CD34^+$  de la FVE cuando se cultivaban en Matrigel expresaban el CD31 y el factor von Willebrand, y Miranville y cols. [101] describieron resultados similares usando células  $CD31^-CD34^+$ . Además, las células  $CD31^-$ , en respuesta al factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), expresan marcadores de célula endotelial [100, 109]. Tanto las células  $CD31^-$  como las  $CD31^+$  han demostrado inducir la angiogénesis en el modelo experimental de isquemia de extremidades posteriores [101-104, 110].

## Introducción

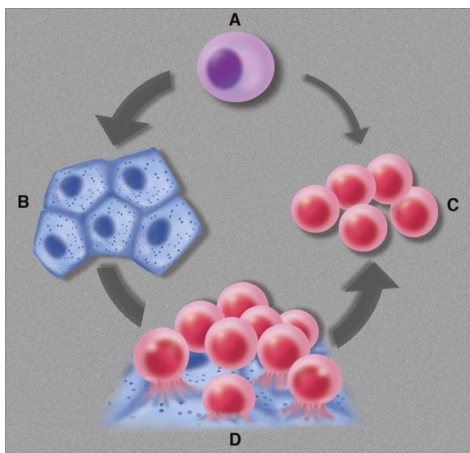
Como se ha mencionado anteriormente, los pericitos y las MSC podrían estar íntimamente relacionados. Traktuev y cols. han demostrado que las células derivadas de la población celular CD34<sup>+</sup> de la FVE del tejido adiposo exhiben un fenotipo y se comportan como verdaderos pericitos, estabilizando los vasos en un modelo de angiogénesis *in vitro* [111]. Más recientemente, estos autores han demostrado que las células aisladas de la FVE cuando se co-implantan con células endoteliales inducen una robusta angiogénesis [112]. Si bien las células de la FVE secretan todo un panel de moléculas angiogénicas [84, 104, 110], lo que favorece la angiogénesis en la zona del inóculo, lo más importante es que se sitúan en la periferia de los vasos recién formados, estabilizándolos [112].

La angiogénesis y la adipogénesis son dos procesos íntimamente relacionados durante la vida prenatal y postnatal [84, 100, 113]. Además, se ha propuesto que las células CD34<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup> de la FVE representan un precursor común para los adipocitos y las células endoteliales [103]. En el tejido adiposo en expansión, la angiogénesis se induce rápidamente [84, 104]. Sin embargo, los progenitores endoteliales circulantes, es decir, provenientes de la médula ósea, no contribuyen de un modo significativo a la neovascularización [114], por lo que el estroma del tejido podría contener células progenitoras endoteliales que satisfacerían las necesidades del propio tejido. Así, se ha descrito que las células CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>, al secretar factor derivado del estroma-1 (SDF-1, *stromal derived factor-1*) inducen la quimiotaxis de las células CD34<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>, que expresan CXCR4, y su diferenciación endotelial [115], poniendo de manifiesto la estrecha relación existente entre las células endoteliales y sus precursores en el nicho estromal.

Además, se ha descrito que las células  $CD34^+CD90^+$  no solo tienen una gran capacidad de proliferación sino que se diferencian en células endoteliales cuando se siembran en metilcelulosa [116], lo que demuestra que la FVE contiene precursores mesodérmicos con más potencial del que se había asumido inicialmente.

### 3.6. *Identificación de células hemangioblásticas en la FVE del tejido adiposo humano*

En la ontogenia temprana, la formación de una primitiva red endotelial en los tejidos extraembrionarios y en el propio embrión está estrechamente asociada con la hematopoyesis primitiva, habiéndose postulado la existencia de un precursor mesodérmico común denominado hemangioblasto (Figura 13) [117].



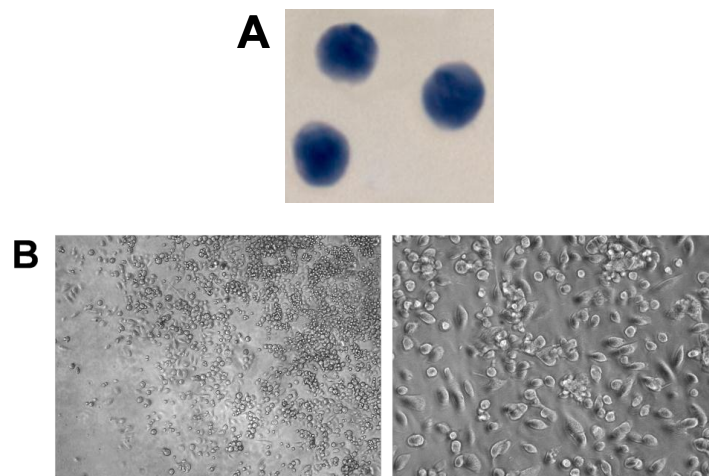
**Figura 13.** El hemangioblasto (A) es un progenitor del mesodermo con capacidad para generar células endoteliales (B) y células hematopoyéticas (C), bien directamente, bien a través de un endotelio hemogénico (D). Imagen tomada de Péault B. Blood 2010;16:2864-2865.

Los sistemas de cultivo de las células stem embrionarias han permitido aislar una población celular que expresa el receptor 2 del VEGF (KDR/flk1) que contiene a las células formadoras de colonias de blastos o hemangioblastos,

## Introducción

cuyos cultivos clonales generan células endoteliales y hematopoyéticas [118–122]. Aunque durante tiempo se consideró que estos precursores mesodérmicos tenían un carácter muy primitivo y por tanto no debían existir en la vida adulta, se han identificado células  $CD34^+KDR^+$  con capacidad para generar colonias mixtas hemato–endoteliales en la SCU y en la médula ósea de adulto [123, 124]. Si su presencia en la vida adulta es una reminiscencia de la vida prenatal, o si por el contrario permanecen en el nicho medular para generar HSC y mantener así la hematopoyesis a lo largo de la vida del individuo queda por demostrar.

En nuestro laboratorio se demostró que la FVE del tejido adiposo humano contenía células  $CD45^-KDR^+CD34^{+/-}$  de muy pequeño tamaño y escasa granularidad, según parámetros citométricos, con una relación núcleo/citoplasma muy alta, que cuando se cultivaban en un medio semisólido enriquecido en factores hematopoyéticos y conteniendo VEGF, factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF, *insulin-like growth factor*), factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) y factor de crecimiento para fibroblastos básico (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) generaban colonias mixtas de células endoteliales y hematopoyéticas (Figura 14). Asimismo, se demostró que las células  $CD45^-$  eran capaces de generar CFU, existiendo una muy buena correlación entre el número de CFU y el número de células  $CD45^-KDR^+$ . En otra serie de experimentos se comprobó que la actividad hematopoyética estaba restringida a las células  $CD45^-CD105^+$ . Estos hallazgos permitieron demostrar que la FVE del tejido adiposo contiene precursores mesodérmicos muy primitivos con capacidad hemangioblástica [125].



**Figura 14. Las células  $CD45^-KDR^+$  generan colonias mixtas de células endoteliales y hematopoyéticas.** A) Tinción May-Grünwald-Giemsa de las células  $CD45^-KDR^+$  (amplificación original 63x). B) Imagen de contraste de fases de las colonias mixtas hemato-endoteliales (amplificación original: imagen de la izquierda 10x; imagen de la derecha 20x). Imagen tomada de Miñana MD y cols. Stem Cells 2008;26:2696-2704.

A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente expuestas, se plantean dos cuestiones básicas:

- a) ¿Las CFU generadas por las células  $CD45^-$  de la FVE derivan de progenitores hematopoyéticos, que originados en la médula ósea entran en circulación y anidan el tejido, o bien tienen su origen en el propio tejido adiposo?
- b) Tiene la subpoblación celular  $CD45^+$  de la FVE actividad hematopoyética?





## OBJETIVOS

Por ello, en el presente trabajo se planteó dar respuesta a esas cuestiones, a la vez que determinar la capacidad angiogénica de las subpoblaciones celulares aisladas de la FVE, en comparación con las MSC generadas en cultivo. Para llevarlo a cabo se abordaron los siguientes objetivos:

Objetivo 1:

Caracterización inmunofenotípica de las células de la FVE del tejido adiposo humano.

Objetivo 2:

Determinación de la actividad hematopoyética *in vitro* de las distintas subpoblaciones celulares de la FVE del tejido adiposo humano.

Objetivo 3:

Determinación de la expresión de los genes que codifican para factores de transcripción hematopoyéticos en las distintas subpoblaciones celulares de la FVE del tejido adiposo humano.

Objetivo 4:

Determinación de la ontogenia de los progenitores eritroides generados por las células de la FVE del tejido adiposo humano.

Objetivo 5:

Determinación de la capacidad angiogénica de las subpoblaciones celulares de la FVE del tejido adiposo humano.



## ***METODOLOGÍA***

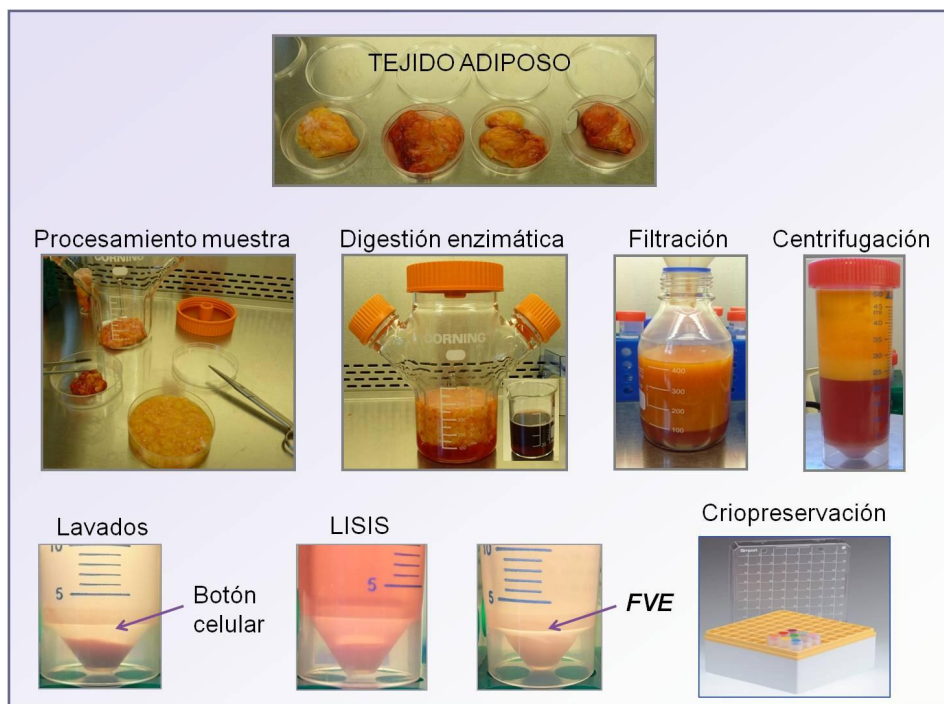


## 1. OBTENCIÓN DE LA FVE DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO

Las muestras de tejido adiposo utilizadas a lo largo de este trabajo procedieron de pacientes de 30 a 40 años de edad, sometidos a una intervención de cirugía plástica (abdominoplastia ó lipectomía abdominal) e intervenidos en el Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV).

Las muestras obtenidas en quirófano se trasladaron inmediatamente al laboratorio, donde se procesaron en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar, siguiendo el protocolo descrito por Miñana y cols. [125].

Brevemente, las muestras se digirieron enzimáticamente con una solución de colagenasa tipo I a 37°C en agitación constante durante 60–90 minutos. Tras eliminar los restos de tejido no digerido mediante filtración, se centrifugó la muestra para eliminar los adipocitos. La suspensión celular obtenida tras lisar los eritrocitos con una solución de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5,7mM y EDTA 2mM) constituyó lo que se denomina fracción vascular estromal o FVE (Figura 15).



**Figura 15: Obtención de la FVE.** Imágenes del procesado de la muestra de lipectomía, desde su obtención hasta el aislamiento de la FVE.

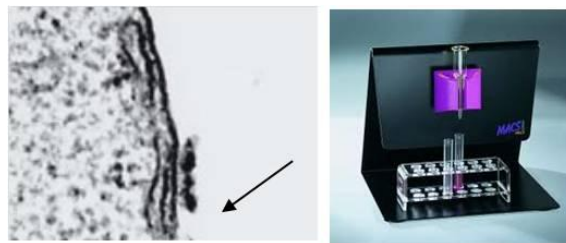
Tras efectuar el recuento celular se procedió al aislamiento de las células de interés, o bien se criopreservaron en  $N_2$  líquido hasta su uso. En este último caso las células se resuspendieron en suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) conteniendo un 10% de dimetilsulfóxido, o en una solución de criopreservación comercial (*BAMBANKER*). En ambos casos las células se congelaron a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL.

## 2. SELECCIÓN CELULAR INMUNOMAGNÉTICA

Las selecciones celulares se llevaron a cabo por métodos inmunomagnéticos, utilizando para ello la tecnología de *MACS®* (Miltenyi *Biotec*). Esta tecnología está basada en la utilización de unas partículas superparamagnéticas y unas columnas rellenas de una matriz de hierro, que

cuando se colocan en un imán se genera un campo magnético en la matriz de la columna lo suficientemente fuerte como para retener las células marcadas. La retirada de la columna del campo magnético permite la elución de las mismas.

Las micropartículas de 50 nm de diámetro, denominadas *MACS Microbeads®*, llevan acoplado un anticuerpo monoclonal específico. La unión antígeno-anticuerpo permite aislar las células de interés con un alto grado de pureza, sin afectar a la estructura o funcionalidad de las mismas (Figura 16). Además, al estar compuestas por una matriz biodegradable, no afecta al cultivo celular. Existen varios tipos y tamaños de columnas, dependiendo del número de células a separar y del tipo de selección celular (positiva o negativa) a realizar.



**Figura 16:** Micrografía electrónica de una *MACS Microbead* unida a una célula en la que se observa la unión de las partículas unidas a la célula mediante anticuerpos específicos (izquierda). Imagen del *MAC Separator*, se puede apreciar el magneto con la columna acoplada (derecha). Imágenes cortesía de *Miltenyi Biotec*.

Así pues, las células de la FVE se incubaron con el anticuerpo monoclonal acoplado a las *MACS Microbeads*. Finalizado el proceso de incubación, se retiraron las partículas no unidas a las células mediante lavado y centrifugación posterior. Acoplada la columna al separador (*MACs Separator®*, Figura 16), se depositaron las células en la columna y se procedió a la

selección celular, según las instrucciones del fabricante. Para la realización del presente trabajo se utilizaron las columnas de selección positiva *LS* y *MS* y la de depleción *LD*.

### 2.1. Selecciones celulares de la FVE

Para llevar a cabo los objetivos propuestos se diseñaron diversas estrategias que nos permitieron aislar las subpoblaciones celulares de interés (Figuras 17 y 18).

**Estrategia 1:** Con el fin de obtener una población de células  $CD34^+$  no fibroblásticas o mesenquimatosas, se procedió en primer lugar a la incubación de las células de la FVE con el anticuerpo monoclonal anti-fibroblasto humano [126, 127]. A continuación, las células que no expresaban el antígeno fibroblasto ( $Fib^-$ ) se separaron, mediante uso del anticuerpo monoclonal anti- $CD34$  humano en las subpoblaciones celulares  $Fib^-CD34^+$  y  $Fib^-CD34^-$  (Figura 17).

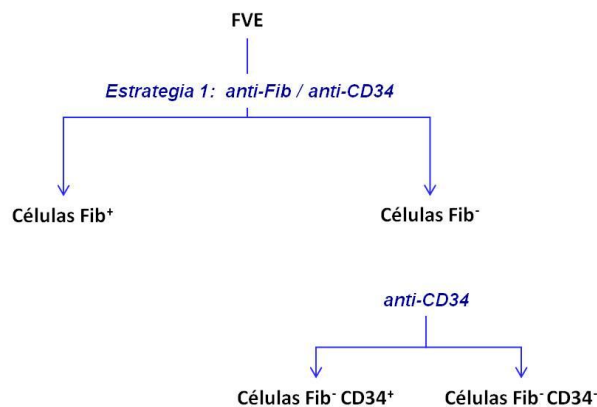


Figura 17: Estrategia 1 de selección celular.

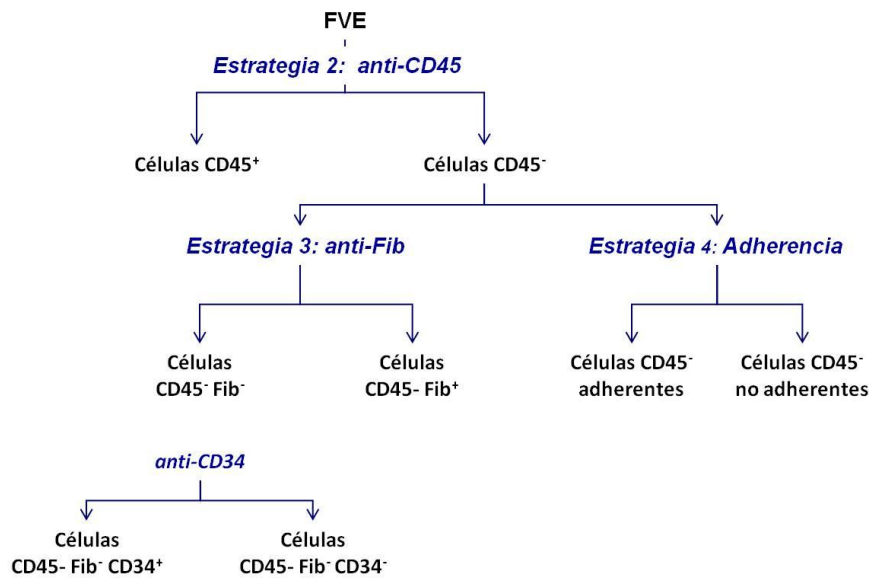


**Estrategia 2:** Obtención de las subpoblaciones celulares de estirpe hematopoyética ( $CD45^+$ ) y no hematopoyética ( $CD45^-$ ), utilizando para ello el anticuerpo monoclonal anti-CD45 humano (Figura 18).

**Estrategia 3:** Obtención de la subpoblación celular de estirpe no hematopoyética ( $CD45^-$ ) deplecionada de células mesenquimatosas/fibroblásticas, y enriquecida en células  $CD34^+$ . Para la obtención de estas células se diseñó una estrategia consistente en la utilización sucesiva de los anticuerpos monoclonales anti-CD45, anti-fibroblasto y anti-CD34 humanos. Ello nos permitió la obtención de las siguientes subpoblaciones celulares:  $CD45^+$ ,  $CD45^-Fib^-$ ,  $CD45^-Fib^+$ ,  $CD45^-Fib^-CD34^+$  y  $CD45^-Fib^-CD34^-$  (Figura 18).

**Estrategia 4:** A diferencia de las anteriores, esta estrategia está basada en las propiedades físicas de las MSC (Figura 18). Estas células al igual que los fibroblastos son muy adherentes al plástico del material de cultivos. Por ello, las células  $CD45^-$  recién seleccionadas se cultivaron en medio DMEM conteniendo un 5% de FBS. A los 7 días se recogieron las células  $CD45^-$  no adherentes.

La pureza de las poblaciones celulares obtenidas se determinó por citometría de flujo.



**Figura 18. Estrategias 2, 3, 4 y 5.** Esquema de las poblaciones celulares obtenidas según las distintas estrategias de selección.

## 2.2. Selección de progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ de sangre de cordón umbilical/placenta y sangre periférica de donante adulto.

Las muestras de SCU se obtuvieron de cordones donados al Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana, no aptos para trasplante por no alcanzar el mínimo de celularidad requerida. Las muestras de sangre periférica (SP), se obtuvieron de donantes sanos en el mismo centro. En todos los casos, bien las madres, bien los donantes, firmaron el consentimiento informado.

Los progenitores hematopoyéticos  $CD34^+$  se obtuvieron a partir de las células nucleadas. Brevemente, la sangre, diluida en una solución tamponada de fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) conteniendo EDTA a una concentración 2mM, se sometió a un gradiente de *Ficoll-Paque PLUS™*. La centrifugación a 400xg durante 35 minutos permitió la formación de una

interfase enriquecida en leucocitos pero empobrecida en granulocitos. Tras varios lavados para eliminar cualquier resto de la solución de *Ficoll*, se procedió a la selección inmunomagnética de las células CD34<sup>+</sup>. Para ello se utilizó el kit de selección de células CD34<sup>+</sup> de *MACS*, compuesto por las *MACS Microbeads* unidas a un anticuerpo monoclonal anti-CD34 humano y una solución de bloqueo de los receptores Fc, cuya finalidad es la de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a las células. La selección celular se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener un mayor grado de pureza, se utilizaron dos columnas *MACS*. El contenido en células CD34<sup>+</sup> se determinó por citometría de flujo.

### 3. CULTIVOS CELULARES

#### 3.1. *Cultivos clonogénicos*

Tal como se ha comentado en la Introducción, los progenitores hematopoyéticos tienen la capacidad de generar CFU, cuando se cultivan en un medio de cultivo semisólido que contiene citocinas hematopoyéticas. Estas CFU, al ser fruto de una expansión clonal, revelan la existencia de los distintos progenitores hematopoyéticos presentes en la muestra. Se trata de un ensayo de tipo retrospectivo, útil para cuantificar los progenitores hematopoyéticos de estirpe mieloide y eritroide.

Los medios de cultivo utilizados fueron *Methocult H4435*, que contiene un 30% de FBS, y *Methocult H4436* que está libre de suero. Ambos medios, basados en metilcelulosa, contienen interleucina (IL)-6, IL-3, factor de crecimiento de células troncales (SCF, *stem cell factor*), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*), factor

## Metodología

estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) y eritropoyetina (EPO, *erythropoietin*).

Los ensayos clonogénicos se llevaron a cabo en placas de Petri de 35 mm de diámetro, utilizando 1,5 mL de medio de cultivo por placa. Los cultivos se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en condiciones de normoxia (20% O<sub>2</sub>). En determinados ensayos la incubación se llevó a cabo en condiciones de hipoxia (5% O<sub>2</sub>), utilizando para ello una cámara de hipoxia de *STEMCELL Technologies* (Figura 19). Las células derivadas de la FVE se sembraron, por duplicado, a una densidad de 50 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>, mientras que las células CD34<sup>+</sup> de SCU y de SP se sembraron a 10 y a 15 células/cm<sup>2</sup>.



**Figura 19:** Cámara de hipoxia para cultivos celulares.

A los 14–21 días de la siembra, se procedió a la identificación y recuento de las CFU mediante uso del microscopio invertido *OLYMPUS CK40*. Las CFU se clasificaron en base a su morfología en Unidades Formadoras de brotes eritroides (BFU-E, *burst-forming unit-erythroid*), CFU de granulocitos y monocitos (CFU-GM, *colony-forming units of granulocytes and monocytes/macrophages*), CFU granulocíticas, eritrocíticas, monocíticas y

megacariocíticas (CFU-GEMM, *colony-forming units of granulocytes, erythrocytes, monocytes/macrophages and megakaryocytes*) y CFU de macrófagos (CFU-M *colony-forming units of macrophages*). El microscopio *Leica DM-IRE2* equipado con una cámara de color *Leica DFC480* se utilizó para realizar fotografías de las CFU.

### **3.1.1. Análisis de las BFU-E**

Para el estudio de las células eritroides contenidas en las colonias BFU-E se procedió de la forma siguiente: En condiciones de esterilidad y con ayuda de una lupa binocular *Leica MZ6*, equipada con un objetivo 2x, se visualizaron las colonias eritroides y se picaron. Las BFU-E así obtenidas se lavaron con PBS para eliminar restos del medio de cultivo, y se centrifugaron a 500xg durante 5 minutos. El botón celular se dividió en dos partes iguales, uno se destinó al estudio de las hemoglobinas fetal (HbF) y adulta (HbA) por citometría de flujo y el otro al análisis de la expresión génica de las distintas globinas.

## **3.2. Cultivos en medio líquido**

### **3.2.1. Cultivo de progenitores hematopoyéticos**

Todas las subpoblaciones celulares de la FVE que tuvieron la capacidad de generar CFU, así como los progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> a partir de la SCU, se sembraron en el medio de cultivo *StemSpan*. Este medio de cultivo es un medio definido libre de suero que contiene transferrina e insulina humanas. Para la expansión de los progenitores hematopoyéticos se añadieron al medio las siguientes citocinas hematopoyéticas: IL-6 (20ng/mL), SCF (100ng/mL), ligando del Flt-3 (FL, *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*) (100ng/mL), y trombopoyetina (TPO, *thrombopoietin*) (20ng/mL) y los siguientes suplementos: seroalbúmina bovina al 1% (BSA, *bovine serum*

## Metodología

*albumin*),  $\beta$ -Mercaptoetanol (0,1mM) y lipoproteínas (40 $\mu$ g/mL). Para evitar posibles contaminaciones fúngicas o microbianas se añadió al medio de cultivo anfotericina (2,5 $\mu$ g/mL) y gentamicina (50 $\mu$ g/mL).

Las células procedentes de la FVE se sembraron a una densidad de 500 x 10<sup>3</sup> células/pocillo (263 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>), y las células CD34<sup>+</sup> de SCU a 75 x 10<sup>3</sup> células (39,5 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>), en placas de 24 pocillos. Los cultivos se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en condiciones de normoxia (20% O<sub>2</sub>). En algunos experimentos los cultivos se incubaron en condiciones de hipoxia (5% O<sub>2</sub>). A los 7 días de cultivo se recogieron las células, y tras efectuar un recuento celular se sembraron en medio semisólido (cultivos clonogénicos) a una densidad celular de 20 x 10<sup>3</sup> a 40 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> (células procedentes de la FVE), y de 20 a 30 células/cm<sup>2</sup> (células CD34<sup>+</sup> de SCU).

### **3.2.2. Cultivo de MSC**

Las MSC son, por definición, adherentes al plástico del material de cultivos. Por ello, el método de aislamiento y cultivo más ampliamente utilizado consiste en sembrar las células de la FVE, retirar las células no adherentes y proseguir el cultivo con las células adheridas. Como la FVE contiene células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup> y algunas de ellas son adherentes al plástico de cultivos, se utilizó como fuente de MSC la subpoblación celular CD45<sup>-</sup> de la FVE.

Las células CD45<sup>-</sup> se sembraron a una densidad de 20 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>, en placas de 6 pocillos en dos medios de cultivo diferentes, DMEM suplementado con un 10% de FBS y EGM-2MV. Este último medio, óptimo para el crecimiento de células endoteliales, está constituido por un medio

basal (EBM) suplementado con un 5% de FBS y los siguientes factores de crecimiento: VEGF, EGF, IGF y bFGF. Además, contiene ascorbato, hidrocortisona, gentamicina y anfotericina-B. Dado que las MSC tuvieron una mayor capacidad de replicación y mantuvieron mejor su morfología cuando se cultivaron en EGM-2MV, este medio fue el utilizado para la realización de los experimentos presentados en este trabajo.

Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> y siempre en condiciones de normoxia. Alcanzada la sub-confluencia se despegaron las células con una solución de tripsina conteniendo EDTA al 0,02%. Los subcultivos se realizaron en las mismas condiciones que los cultivos primarios. El seguimiento de todos los cultivos, se realizó mediante microscopía óptica, tomando un registro de su evolución mediante fotografías de los mismos.

#### 4. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico, que permite determinar en un mismo análisis las características intrínsecas de la célula como son los parámetros relacionados con su tamaño (FSC, *forward scatter*) y complejidad (SSC, *side scatter*) relativos, y sus características antigénicas (inmunofenotipo).

Para la realización de este trabajo se han utilizado dos citómetros, el *FACSCalibur®* de 2 láseres y el *FACSCanto II®* de 3 láseres, ambos de *BD Biosciences*. La combinación de los distintos láseres permite usar hasta 6

Metodología

fluorocromos diferentes, pudiendo así obtener hasta 8 parámetros diferentes por célula (FSC, SSC y 6 fluorescencias diferentes).

#### **4.1 Inmunofenotipo**

Para determinar la expresión de antígenos de membrana en las subpoblaciones celulares aisladas de la FVE, se usaron anticuerpos monoclonales que permitieran caracterizar células de una misma estirpe o células de distintas estirpes.

- Progenitor hematopoyético: CD45, CD34, Tie-2, CD117, VEGFR2/KDR, VEGFR1/Flt-1, CD144, CD143/BB9.
- Células hematopoyéticas: CD45, CD43, CD34, CD133, CD184, CD14, VEGFR1/Flt-1.
- Células endoteliales: CD34, CD31, Tie-2, VEGFR2/KDR.
- MSC: CD90, CD105, CD13, CD9, MSCA-1, CD143/BB9, CD146.

Esta clasificación, no obstante, es meramente orientativa. Así, por ejemplo la expresión del CD31 en una célula CD45<sup>+</sup> puede indicar bien un monocito si expresa también el CD14, bien un progenitor hematopoyético si expresa el CD34. Adicionalmente, la expresión de CD13 o CD90 no es exclusiva de una célula mesodérmica primitiva o una MSC, pues muchas células hematopoyéticas también lo expresan. Por lo tanto, es necesario determinar la expresión conjunta de varios antígenos para caracterizar una célula.

*Procedimiento de tinción:* Las células, resuspendidas a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL en una solución de PBS conteniendo BSA al 0,5% y EDTA a una concentración 1mM, se incubaron con una solución de bloqueo (IgG ó *Fc blocking*) para evitar uniones inespecíficas o reducir el marcaje inespecífico



por receptores Fc. A continuación, a  $1 \times 10^6$  de células se les añadió el o los anticuerpos seleccionado/s y la suspensión resultante se incubó a 4°C en oscuridad, durante 30–45 minutos. Tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante lavado y centrifugación, las células se resuspendieron en una solución de 7-aminoactinomicina D (7-AAD), lo que permitió analizar las células viables. En todos los casos se realizaron controles isotípicos. Para ello, las células se incubaron con las IgG correspondientes conjugadas con los mismos fluorocromos. Los *softwares* de adquisición y análisis utilizados fueron: *BD CellQuest Pro* (citómetro *FacsCalibur*) y *BD Facs Diva* (*FacsCanto II*).

#### **4.2 Expresión intracelular de hemoglobinas**

Se analizó la expresión de la HbF y la HbA sintetizadas por las células eritroides generadas en cultivo, y obtenidas tal y como se describe en el apartado 3.1 de la Metodología. Al estar las hemoglobinas en el citoplasma se realizó una tinción intracitoplasmática.

*Procedimiento de tinción:* El procedimiento utilizado consistió en una primera fijación de las células en una solución de paraformaldehído (*BD Cytofix Buffer*) a 4°C y una segunda fijación a temperatura ambiente con una solución de glutaraldehído al 0,05% en PBS. Las células fijadas se permeabilizaron con una solución de Triton-X-100 en PBS conteniendo BSA al 1%. Las células fijadas y permeabilizadas se incubaron con los siguientes anticuerpos: anti-hemoglobina fetal humana conjugada con FITC, anti hemoglobina- $\beta$  humana conjugada con PE, anti-CD45 humano conjugado con PerCP y Glicoforina-A humana conjugada con APC.

Transcurridos 30 minutos de incubación en oscuridad y a 4°C, las células se fijaron con paraformaldehído diluido al 1% en PBS hasta su adquisición y

Metodología

posterior análisis. El software de adquisición y análisis utilizado fue el *BD Facs Diva*.

Los anticuerpos específicos, conjugados con los distintos fluorocromos, utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 1.

ANTÍGENO	FLUOROCROMO	CLON	ISOTIPO	CASA COMERCIAL
CD9	APC	M-L13	IgG1κ	BD Biosciences
CD13	FITC	WM15	IgG1κ	BD Pharmingen
CD14	FITC	MΦP9	IgG1	BD Biosciences
	PE	MΦP9	IgG1	BD Biosciences
	APC-H7	MΦP9	IgG1	BD Pharmingen
CD31	FITC	WM59	IgG1	BD Biosciences
CD34	PE	WM59	IgG1	BD Pharmingen
	PE-CY7	8G12	IgG1	BD Biosciences
	APC	8G12	IgG1	BD Biosciences
CD43	FITC	1G10	IgG1κ	BD Pharmingen
CD45	FITC	2D1	IgG1	BD Biosciences
	PER-CP	2D1	IgG1	BD Biosciences
	APC-H7	2D1	IgG1	BD Pharmingen
CD90	FITC	5E10	IgG1κ	BD Pharmingen
CD105 (Endogлина)	APC	5E10	IgG1κ	BD Pharmingen
	PE	SN6	IgG1	eBiosciences
CD117 (c-kit)	PE	YB5-B8	IgG1κ	BD Pharmingen
CD133/1	APC	AC133	IgG1	Miltenyi Biotec
CD133/2	PE	293C3	IgG2b	Miltenyi Biotec
CD143 (BB9)	PE	5-369	IgG1κ	Biolegend

<b>CD144 (VE-Cadherina)</b>	APC	16B1	IgG1κ	eBiosciences
<b>CD146</b>	PE	P1H12	IgG1κ	BD Pharmingen
<b>CD184 (CXCR-4)</b>	APC	12G5	IgG2Aκ	BD Pharmingen
<b>CD202b (TIE-2/TEK)</b>	PE	33,1	IgG1κ	Biolegend
	APC	83715	IgG1κ	R&D Systems
<b>CD235A (Glicoforina)</b>	APC	GA-R2 (HIR2)	IgG2bκ	BD Pharmingen
<b>CD309 (VEGFR-2/KDR)</b>	APC	ES8-20E6	IgG1	Miltenyi Biotec
	APC	89106	IgG1κ	R&D Systems
<b>Human Hematopoietic Progenitor Cells</b>	PE	BB9	IgG1κ	BD Biosciences
<b>Hb Fetal</b>	FITC	2D12	IgG1κ	BD Pharmingen
<b>Hb Adulta (Cadena β)</b>	PE	37-8	IgG1κ	Santa Cruz Biotechnologies
<b>MSCA-1</b>	PE	W8B2	IgG1	Miltenyi Biotec
	APC	W8B2	IgG1	Miltenyi Biotec
<b>VEGFR1/Flt-1</b>	APC	49560	IgG1κ	R&D Systems

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados en el análisis citométrico.** FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; APC, aloficocianina; PerCP, proteína peridinin clorofila; PE-Cy7, ficoeritrina-cianina 7; APC-H7, aloficocianina-análogo de cianina 7.

## 5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Se analizó la expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción hematopoyéticos *GATA1*, *GATA2*, *RUNX1*, *RUNX2* y *SCL/TAL1* en las subpoblaciones celulares de la FVE, recién aisladas y tras cultivo en medio líquido, en las células CD34<sup>+</sup> de SCU recién aisladas y tras cultivo en medio líquido, y en las células CD34<sup>+</sup> de SP recién aisladas.

Metodología

Asimismo, en las células eritroides generadas en los distintos cultivos se determinó la expresión de los genes de las globinas  $\alpha$  y  $\zeta$  pertenecientes al *cluster* alfa, y de las globinas  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\varepsilon$  pertenecientes al *cluster* beta.

### **5.1 Extracción y cuantificación del ARN total**

El ácido ribonucleico (ARN) total de las células, criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en forma de botón celular, se extrajo con *TRIZOL® Reagent*. Este reactivo es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina, que disuelve la célula y sus componentes celulares, manteniendo íntegro el ARN.

Tras realizar la lisis celular, se separaron las fases orgánica y acuosa con cloroformo y se precipitó el ARN total con isopropanol. Posteriormente se realizaron varios lavados con etanol al 75%, con el fin de retirar restos orgánicos de la muestra. Los restos de etanol se eliminaron por evaporación, dejando secar las muestras en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el ARN obtenido se resuspendió en  $20\mu\text{L}$  de agua tratada con dietilpirocarbonato. A continuación, las muestras se trataron con DNasa, para eliminar posibles restos de ácido desoxirribonucleico (ADN).

El ARN de cada muestra se cuantificó mediante espectrofotometría (medida de la absorbancia a  $260\text{nm}$  y  $280\text{nm}$ ), utilizando el *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000*.

### **5.2 Retrotranscripción**

Se utilizaron  $300\text{ng}$  de ARN total para su conversión en el correspondiente ADN complementario (ADNc) mediante acción de la transcriptasa reversa. Para ello se utilizaron la enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* y los reactivos del kit *TaqMan® Reverse Transcription Reagents*.

Se realizaron controles “minusRT” para cada una de las muestras, que incluyeron todos los reactivos excepto la enzima transcriptasa reversa.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en el termociclador *9800 Fast Thermal Cycler*, bajo las siguientes condiciones experimentales: incubación a 25°C durante 10 minutos, seguida de un ciclo a 48°C durante 30 minutos. Finalizada la reacción se inactivó la enzima transcriptasa reversa incubando las muestras a 95°C durante 5 minutos. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **5.3 PCR en tiempo real**

La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR, *real time-polymerase chain reaction*) es actualmente el método más sensible y preciso para detectar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm).

Este método permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través de la utilización de compuestos fluorescentes, de forma que al determinar el incremento de fluorescencia, se puede determinar el incremento del producto formado. Este tipo de determinación es semicuantitativa.

A partir del ADNc, se analizó la expresión relativa de los genes de interés. Para ello, se utilizaron los cebadores específicos para cada gen. Se trata de secuencias sintéticas de oligonucleótidos de aproximadamente 20 bases de longitud con una secuencia específica y complementaria al ADN de interés. El par de cebadores, directo (5'-3') y reverso (3'-5'), se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar. Este proceso, se desarrolla en 3 pasos básicos, que se repiten durante 40 ciclos:

#### Metodología

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del ADN
- Unión: unión específica de los cebadores a sus secuencias complementarias
- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del cebador respectivo.

Los niveles de expresión de los genes se determinaron utilizando los ensayos *TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)*: *SCL/TAL1* (Hs001097987\_m1), *RUNX1* (Hs01021971\_m1), *RUNX2* (Hs01047978\_m1), *GATA1* (Hs01085823\_m1), *GATA2* (Hs00231119\_m1), *α-globin* (Hs00361191\_g1), *β-globin* (Hs00747223\_g1), *γ-globin* (Hs00361131\_g1), *δ-globin* (Hs00426283\_m1), *ε-globin* (Hs00362216\_m1) y *ζ-globin* (Hs00923579\_m1). Se realizaron dos réplicas de cada uno de los genes a estudiar, en cada una de las muestras. El gen control o de expresión constitutiva (*housekeeping*) utilizado fue el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*, Hs99999905\_m1).

En todos los ensayos se utilizaron controles negativos de la PCR (ntc) para detectar una posible contaminación de los reactivos, y controles para determinar la presencia de ADN genómico (minusRT). Los ntc incluyeron todos los reactivos de la PCR excepto la muestra de ADNc, mientras que los controles minusRT incluyeron todos los reactivos de la PCR y, como muestra, el minusRT procedente de la reacción de retrotranscripción. El termociclador utilizado fue el *HT7900 Fast Real-Time PCR System*, y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C de 10 minutos, y 40 ciclos de 95°C de 15 segundos, seguidos de 1 minuto a 60°C.

Para cada muestra, se determinó el ciclo umbral (Ct), usando el *Sequence Detection Software*, también de *Applied Biosystems*. La expresión relativa de los genes en estudio se calculó en función del gen *GAPDH*, usado como gen de referencia, mediante el método de  $2^{-\Delta Ct}$

#### **5.4 Electroforesis en geles de agarosa**

Los productos de la RT-PCR correspondientes a los ensayos de expresión de los genes de las globinas se visualizaron en geles de agarosa al 3% en tampón TAE (Tris-acetato 40mM conteniendo EDTA 1mM).

En cada pocillo se cargaron 5µL del producto final de la PCR junto con 1µL de tampón de carga. Se usó el control de pesos moleculares O'Range Ruler de 50pb (50pb hasta 1000pb). El voltaje utilizado en la electroforesis fue de 40V los primeros 15 minutos y 70V los siguientes 40 minutos. Las bandas del producto amplificado en el gel se visualizaron mediante una solución de bromuro de etidio al 1% y una fuente de luz UV. Para la visualización y adquisición de las imágenes se utilizó el "Sistema de documentación de geles GBOX" y el software *GeneSnap*.

## **6. ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS *IN VIVO***

Para determinar la capacidad angiogénica *in vivo* de las células aisladas de la FVE se utilizaron ratones atímicos desnudos *Foxn1<sup>nu</sup>* (nu/nu) (*Laboratorios Harlan*). Estos ratones poseen una mutación autosómica recesiva del alelo *nu* en el cromosoma 11, lo que les produce una disfunción del timo y hace que carezcan completamente de pelo (fenotípicamente calvos). Estos

## Metodología

animales son deficientes en células T y no generan células T citotóxicas, aunque mantienen la función normal de las células B y las NK.

Por su condición inmunológica, la estabulación se realizó en condiciones libres de patógenos, utilizándose para ello racks ventilados y alimentación gamma-irradiada. Además todas las manipulaciones se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, utilizando cabinas de flujo laminar. Este modelo de experimentación animal fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Fundación de Investigación del CHGUV.

El modelo de angiogénesis *in vivo* utilizado es el descrito por Passaniti y cols. [128]. Este modelo está basado en el uso de una solución de Matrigel que cuando se inyecta en el animal gelifica, por efecto de la temperatura, y es capaz de soportar una neovascularización en respuesta a células y/o factores angiogénicos.

El Matrigel™ es una preparación de extracto de membrana basal del tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), tumor murino muy rico en proteínas de matriz extracelular. Su componente mayoritario es la laminina, además de la entactina, colágeno IV, y proteoglicanos. También contiene factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor- $\beta$* ), activador tisular de plasminógeno, y otros factores de crecimiento que se producen normalmente en el tumor de EHS. Una de las propiedades del Matrigel es que se mantiene líquido a 4°C, y polimeriza a temperatura ambiente, generando una matriz biológicamente activa que simula una membrana basal de células de mamífero. Existen varios tipos de Matrigel, enriquecidos o no en factores de crecimiento, y conteniendo o no el indicador rojo fenol. Para



la realización de los ensayos de este trabajo de investigación se ha utilizado el Matrigel reducido en factores de crecimiento (Matrigel-GFR™).

### **6.1 Preparación del implante celular**

La suspensión formada por el Matrigel y las células se preparó del siguiente modo: A un volumen de 400µL de Matrigel-GFR se añadieron  $1 \times 10^6$  células en un volumen de 50 µL de PBS. Se determinó la angiogénesis inducida por las células seleccionadas de la FVE (CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>) y por las MSC generadas a partir de las células CD45<sup>-</sup> de la FVE.

En algunos experimentos se añadió a la suspensión celular a implantar bFGF (recombinante humano) y heparina, a una concentración final de 150 ng/mL y 65 U/mL, respectivamente. La preparación de la suspensión celular se realizó a 4°C, utilizando material previamente enfriado.

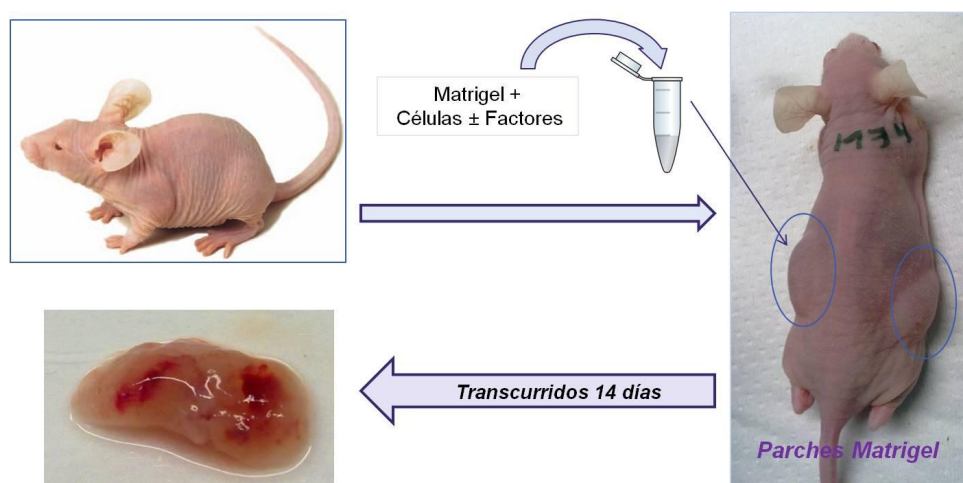
### **6.2 Procedimiento animal**

Los ratones fueron anestesiados utilizando una mezcla de ketamina (*Ketalar®*) y medetomidina (*Domtor®*), a una concentración de 75 mg/kg y de 0,5 mg/kg, respectivamente. Una vez dormido el animal, se le colocó en posición decúbito prono (boca abajo) y se le realizó un bolsillo subcutáneo en ambos flancos del dorso del animal, moviendo en distintas direcciones la aguja de la jeringa, para separar la dermis del tejido muscular inferior. Una vez realizado el bolsillo, se inyectó la mezcla fría, que polimerizó a los pocos minutos (Figura 20). En todos los casos se inocularon dos implantes por ratón, utilizando para ello agujas de 27G y jeringas de insulina previamente enfriadas a -20°C. Se revirtió el efecto de la anestesia utilizando atipamezol (*Revertor®*) a una dosis de 0,5 mg/kg de peso.

A los 14 días de la colocación del implante, se inyectó una solución de

## Metodología

dextrano conjugado con FITC al 5% en PBS en la vena de la cola, y transcurridos 5-7 minutos se sacrificó al animal. La eutanasia se realizó mediante una inyección de pentobarbital sódico (*Doletal®*) a una dosis de 160 mg/kg de peso. Una vez extraídos los implantes se realizaron fotografías de los mismos con una cámara *LUMIX DMC-TZ5*. La vasculatura fluorescente del matrigel se visualizó con un microscopio de fluorescencia *Leica DM6000B* dotado con una cámara *Leica DC350FX*.



**Figura 20: Diseño experimental.** La suspensión celular se inculó subcutáneamente en la zona dorsal del ratón formando los implantes. Transcurridos 14 días se extirparon y se procesaron para realizar el análisis histológico de los mismos.

## 7. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS IMPLANTES DE MATRIGEL

Los implantes de matrigel se fijaron durante 48 horas a temperatura ambiente en la solución de fijación “*Zinc Fixative*”. Esta solución, al no contener formaldehído, es más adecuada para la inmunohistoquímica, pues conserva todos los epítomos de la proteína. Después se deshidrataron e incluyeron en parafina, utilizando el inclusor de parafina *LEICA EG1150H*, y se

efectuaron cortes seriados de 5–6  $\mu\text{m}$  de espesor, utilizando un microtomo de Minot *LEICA RM2135*. Los cortes se destinaron a las tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson o a inmunohistoquímica.

### **7.1 Inmunohistoquímica con anti-CD31**

Brevemente, antes de la incubación con el anticuerpo anti-CD31 murino, desarrollado en rata, se bloqueó la enzima peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol. Tras varios lavados con PBS, la muestra se incubó con el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se bloquearon las uniones inespecíficas utilizando una solución tamponada de TRIS salino conteniendo un 10% de FBS y un 0,5% de BSA durante una hora. Se utilizó el kit de detección *IgG HRP Detection Kit (BD Pharmingen)*, que contiene el anticuerpo secundario, y la enzima peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*), siguiendo las instrucciones del fabricante. La contratinción se realizó utilizando hematoxilina de Harris.

### **7.2 Inmunohistoquímica con anti-CD45 y anti-eNOS**

A diferencia del protocolo de inmunohistoquímica utilizado para detectar la expresión del antígeno CD31, hubo que someter a las muestras a un tratamiento para la recuperación de antígenos, mediante la solución *Antigen Retrieval* de Dako. Tras bloquear la peroxidasa endógena, se procedió a la incubación con los distintos anticuerpos primarios durante toda la noche, a 4°C. Tras bloquear las uniones inespecíficas se reveló utilizando el kit *LSAB+ System (Dako)*. Este kit es muy versátil, ya que contiene anticuerpos secundarios biotinilados anti-cabra, anti-ratón y anti-conejo, por lo que se puede utilizar con una amplia variedad de anticuerpos primarios. Así mismo, también contiene el enzima HRP conjugada con estreptavidina y las soluciones

Metodología

de revelado con diaminobenzidina. En este caso la contratinción también se realizó con hematoxilina de Harris.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el *software GraphPad PRISM®* versión 5. En todos los casos se realizó la media y el error estándar del número de repeticiones por experimento.

Se realizó el test de Kolmogorov-Smirnoff para determinar la distribución de los datos obtenidos. Se determinó la significancia estadística mediante la prueba paramétrica de la *t* de Student o la no paramétrica de la U de Mann-Whitney, según correspondiera. En todos los casos se consideraron las diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor fue menor de 0,05.

***RESULTADOS***

***Y***

***DESARROLLO ARGUMENTAL***



## OBJETIVO 1

**CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS DE LA FVE DEL  
TEJIDO ADIPOSEO HUMANO**

**1.1 Rendimiento Celular del Proceso de Digestión del Tejido Adiposo**

Con el fin de hacer una estimación del número de células que se obtiene al final del proceso de digestión, se registraron los pesos de las muestras procedentes de las lipectomías en los siguientes pasos del proceso: (A): peso de la muestra obtenida en quirófano; (B): peso de la muestra exenta de material de desecho (vasos, material cauterizado, etc) y (C): peso del material no digerido al final del proceso de digestión con la enzima colagenasa. El rendimiento celular se expresó como  $N^{\circ}$  de células / (A-B-C).

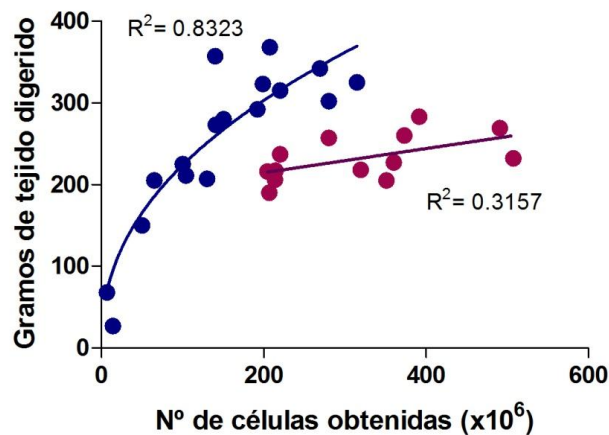


Figura 21. Correlación entre el número de células obtenidas y los gramos de tejido digerido.

Tal como se puede observar en la Figura 21, en la mayoría de las muestras procesadas hubo una muy buena correlación entre el número de células obtenidas al final del proceso de digestión y el peso de la muestra digerida ( $R^2 = 0,83$ ). Sin embargo, en algunas de las muestras cuyo peso fue igual o superior a 200 g el número de células obtenido fue independiente del peso de la muestra ( $R^2 = 0,32$ ). La falta de linealidad puede ser debida a factores tales como el tiempo de incubación y la temperatura que alcanza la muestra durante el proceso de digestión. No obstante, a partir de los datos obtenidos se puede estimar que por cada gramo de tejido procesado se obtienen  $559,73 \times 10^3 \pm 12,8 \times 10^3$  células.

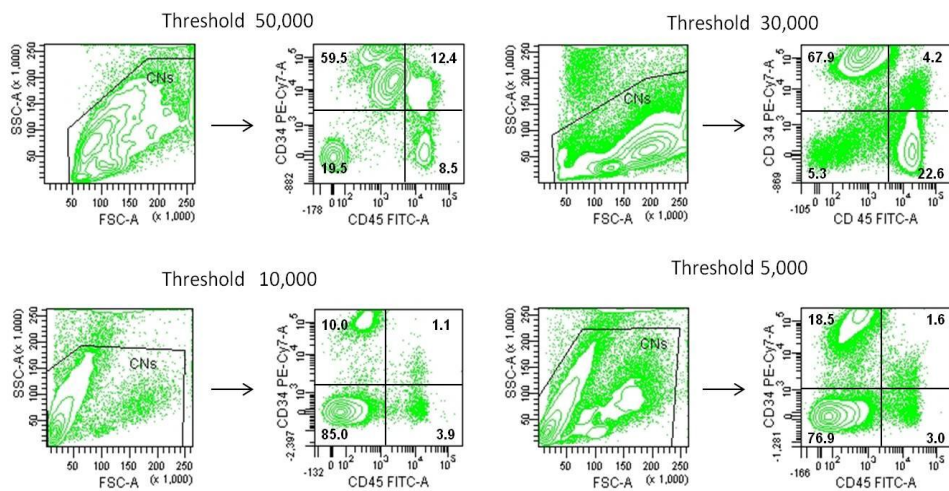
### ***1.2 Expresión de antígenos de membrana en las células de la FVE***

La FVE del tejido adiposo está compuesta por una población celular altamente heterogénea, incluyendo entre otras, células hematopoyéticas, células endoteliales de la microvasculatura y MSC. Tal como se ha descrito previamente en la Introducción, la FVE del tejido adiposo difiere del estroma de la médula ósea por poseer un alto contenido en células  $CD34^+$ . No obstante, los datos existentes en la literatura sobre el porcentaje que representan las células  $CD34^+$  en el total de la FVE, son muy poco uniformes [80, 103, 125]. Es posible, que la variabilidad de los datos publicados sea debida en parte a las distintas condiciones usadas en los análisis citométricos.

Efectivamente, tal como se muestra en la Figura 22 el porcentaje de células  $CD34^+$  en la FVE fue dependiente del valor para el umbral (threshold) en el parámetro de FSC utilizado durante la adquisición de las muestras. Dado que un gran porcentaje de las células de pequeño tamaño de la FVE, solo visibles con el uso de umbrales bajos de FSC, carecían de la expresión del



antígeno CD34, el contenido en células CD34<sup>+</sup> estuvo directamente relacionado con dicho parámetro citométrico. Así, para una misma muestra el porcentaje en células CD34<sup>+</sup> osciló entre un 70%-80% y un 15%-25% para valores de umbral altos y bajos de FSC, respectivamente, lo que justificaría la variabilidad de los datos publicados.

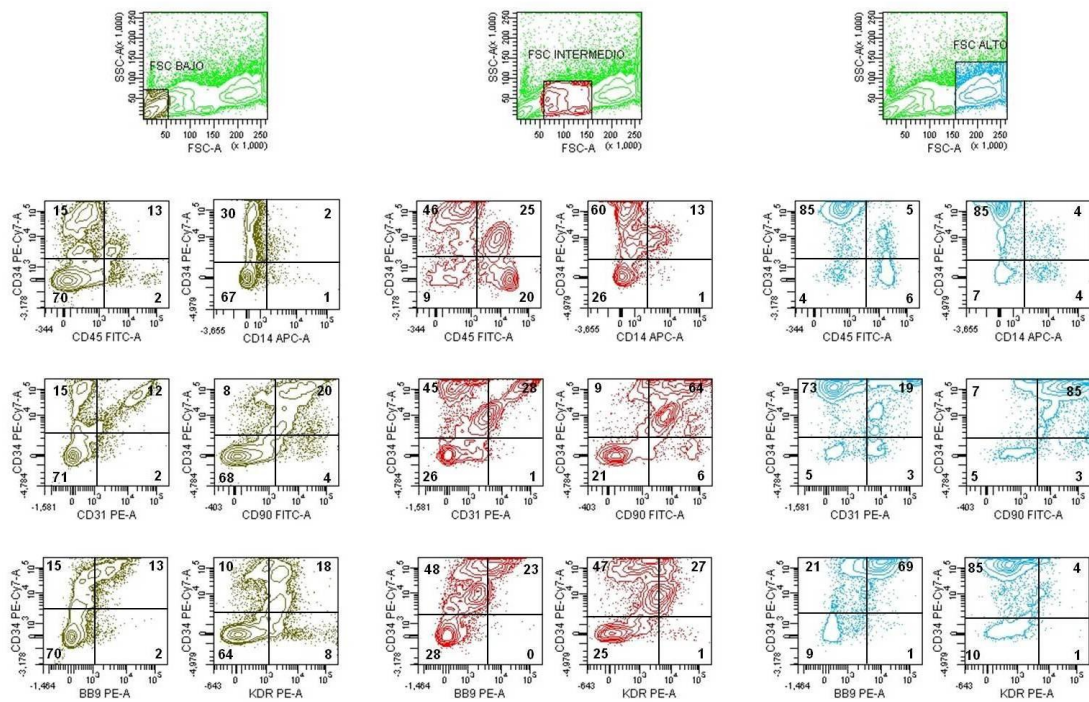


**Figura 22: Efecto de diferentes FSC thresholds en el análisis de las células de la FVE.**

Las células de la FVE se adquirieron con distintos valores para el umbral (threshold) de FSC y se analizaron para la expresión de CD34 y CD45. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células contenido en cada uno de ellos.

Por ello, en primer lugar se realizó una caracterización inmunofenotípica de las células de la FVE atendiendo a parámetros FSC y SSC. La adquisición de las células de la FVE con un FSC threshold de 5000, facilitó el análisis de tres subpoblaciones celulares bien definidas (Figura 23). La ventana realizada para incluir las células de muy pequeño tamaño (FSC bajo) reveló que aproximadamente un 70%-75% de las células careció de la expresión de CD34, CD45, CD31, CD90, BB9, KDR y por supuesto de CD14.

Lo más significativo de esta subpoblación celular fue la presencia de una población discreta de células  $CD34^+CD31^+$ , que debe corresponder a las células endoteliales de la microvasculatura, previamente descrita por varios grupos. En cuanto a las células  $CD34^+$  presentes, los análisis demostraron que una gran parte de ellas expresó el CD90, evidenciando su carácter mesodérmico primitivo.



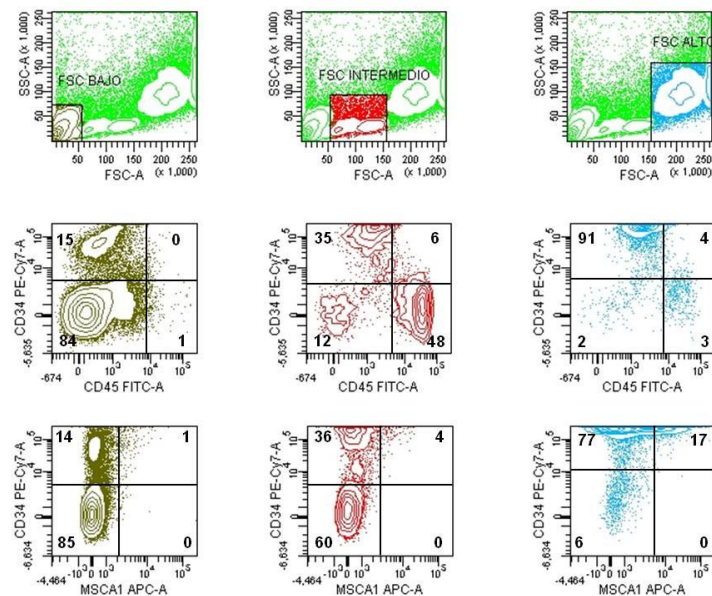
**Figura 23: Estudio inmunofenotípico de las células de la FVE en función del tamaño relativo.** Las células seleccionadas en base al FSC, y representadas con distintos colores, se analizaron para determinar la expresión de los antígenos CD45, CD34, CD31, BB9, CD14, CD90 y KDR. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células contenido en cada uno de ellos. Las células contenidas en el FSC bajo, FSC intermedio y FSC alto representaron el 45%, 25% y 30% de las células viables analizadas, respectivamente.

Es interesante señalar la existencia de células positivas para el VEGFR2/KDR. Si bien la expresión de este antígeno no definió poblaciones celulares discretas, sí pone de manifiesto el carácter angiogénico de las células de la FVE. El análisis de las células de tamaño intermedio (FSC intermedio) demostró que la práctica totalidad de las células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup> estaba contenida en esta subpoblación celular. Por último, la gran mayoría de las células contenidas en la subpoblación de células de gran tamaño (FSC alto) expresó el antígeno CD34 y el CD90, por lo que debe corresponder a la población celular mesenquimal. Es importante señalar que, independientemente del tamaño y complejidad relativos de las células, o lo que es lo mismo, de su distribución según los parámetros de FSC y SSC, una elevada proporción de células CD34<sup>+</sup> fue positiva para el antígeno BB9, cuya expresión parece estar restringida a progenitores estromales y hematopoyéticos [129, 130]. También se pudo apreciar la existencia de células CD45<sup>+</sup> que expresaban el CD14, y que deben corresponder a monocitos y/o macrófagos residentes en el tejido.

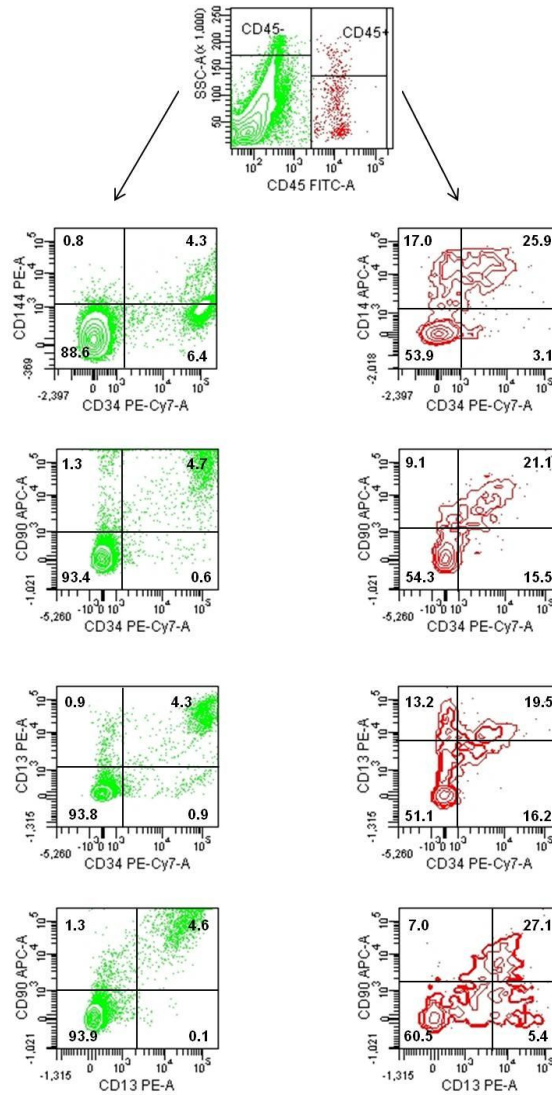
Con el fin de caracterizar mejor las MSC de la FVE, se utilizó el anticuerpo anti-MSCA-1 (*mesenchymal stromal antigen-1*) [131]. Tal como se puede observar en la Figura 24, las células MSCA-1<sup>+</sup>, que también expresaron el CD34, estuvieron contenidas en la subpoblación de células de gran tamaño (FSC alto). De nuevo, tal como se había apreciado en el anterior análisis (Figura 23), la población celular hematopoyética estuvo contenida en las células de tamaño intermedio.

Así pues, habiendo analizado el fenotipo de las células de la FVE en función de sus características citométricas de FSC, se llevó a cabo un análisis más restrictivo, basado en la expresión del antígeno panleucocitario

CD45. Con el fin de poder analizar las células de pequeño tamaño de la FVE, las células se adquirieron con un FSC threshold de 5000. Tal como se observa en la Figura 25, la práctica totalidad de las células CD45<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> expresó los antígenos CD13 y CD90, y aproximadamente el 50% el CD144, poniéndose en evidencia el carácter mesodérmico de las células estromales CD45<sup>-</sup>. Sin embargo, y de manera sorprendente, aproximadamente un 25%-30% de las células CD45<sup>+</sup> expresó el antígeno CD34. Como si de células estromales se tratara, las células CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> también expresaron el CD90 y el CD13.



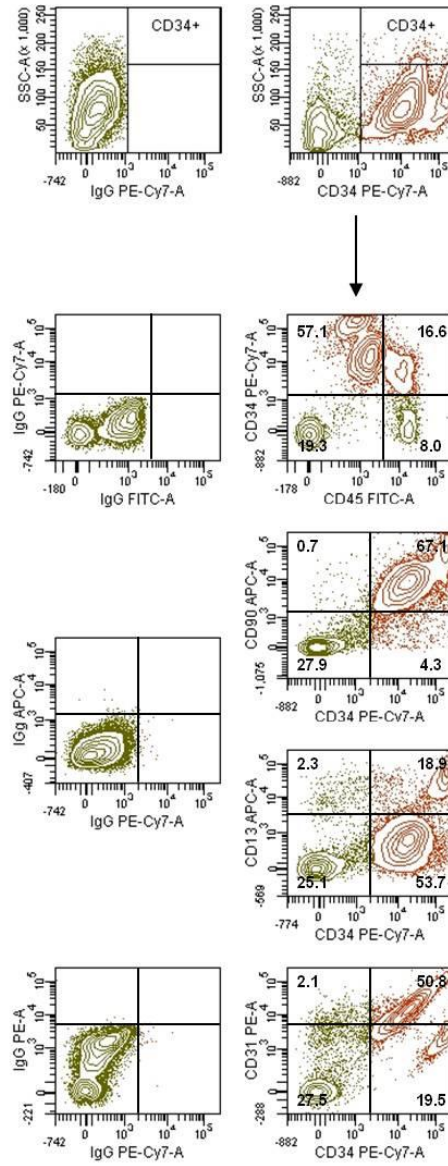
**Figura 24. Identificación de las células hematopoyéticas y mesenquimatosas en la población celular de la FVE.** Se determinó la expresión de los antígenos CD45, CD34 y MSCA-1 en las subpoblaciones celulares analizadas según características de FSC, representadas con distintos colores. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células que expresan los antígenos correspondientes. Las células contenidas en el FSC bajo, FSC intermedio y FSC alto representaron el 65%, 15% y 20% de las células viables analizadas, respectivamente.



**Figura 25: Análisis inmunofenotípico de las células de la FVE en función de la expresión del antígeno CD45.** Los análisis de las subpoblaciones celulares CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>, representadas con colores diferentes, se efectuaron de manera independiente. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células contenido en cada uno de ellos, tomando a cada subpoblación celular como un todo. Las células CD45<sup>+</sup> representaron el 93% del total de las células viables analizadas.

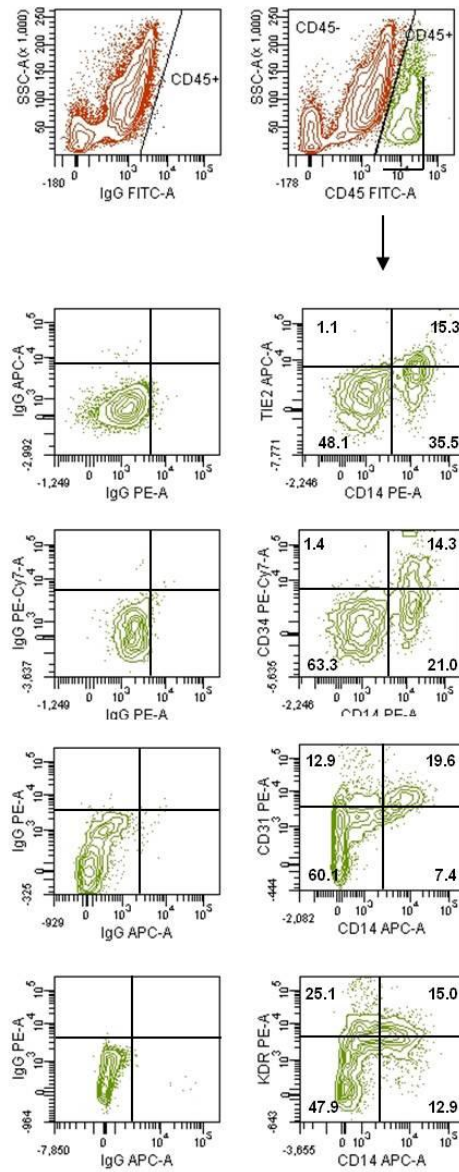
Por último, se analizaron las células de la FVE en base a la expresión del antígeno CD34. Con el fin de aumentar el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> de la muestra, se utilizó un FSC threshold de 30000. En la Figura 26 se muestra cómo la práctica totalidad de las células CD34<sup>+</sup> expresó el CD90, y el CD13. Al igual que lo observado anteriormente, un porcentaje muy elevado de las células CD45<sup>+</sup> expresó el CD34. Por ello, se efectuó un posterior análisis de la subpoblación celular CD45<sup>+</sup>, con especial énfasis en las células CD14<sup>+</sup>.

La Figura 27 demuestra, sin lugar a dudas, que las células CD45<sup>+</sup> de la FVE del tejido adiposo humano exhiben un fenotipo completamente diferente al de las células hematopoyéticas circulantes de un individuo adulto. Así, e independientemente de la elevada proporción de células CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>, se pudo apreciar la existencia de células CD14<sup>+</sup> que expresaban CD34, Tie-2, KDR y CD31. A excepción de la expresión del CD31, estas células CD14<sup>+</sup> exhiben un perfil antigénico que no recuerda al de los monocitos CD14<sup>+</sup> circulantes en la sangre. Por lo tanto, es posible que las altas concentraciones locales de moléculas angiogénicas en el tejido adiposo [84] promuevan o induzcan la transformación de los monocitos circulantes en monocitos pro-angiogénicos [132-134], contribuyendo así a las necesidades angiogénicas de este tejido.



**Figura 26: Análisis inmunofenotípico de las células CD34<sup>+</sup> de la FVE.** Las células CD34<sup>+</sup>, representadas en rojo se analizaron para determinar la co-expresión de los antígenos CD45, CD90, CD13 y CD31. Los controles isotópicos se muestran en la izquierda de la figura. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células que expresan o no los antígenos seleccionados.





**Figura 27: Análisis inmunofenotípico de las células CD45<sup>+</sup> de la FVE.** Las células CD45<sup>+</sup>, representadas en verde, se seleccionaron para analizar las células CD14<sup>+</sup> y su co-expresión con los antígenos Tie-2, CD34, CD31 y KDR. Los controles isotópicos se muestran en la izquierda de la figura. Los gráficos de puntos que muestran el CD14 conjugado con APC o PE corresponden a tres muestras diferentes. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células que expresan o no los antígenos seleccionados.



### ***1.3 Frecuencias de las diversas subpoblaciones celulares de la FVE***

A partir de los análisis realizados por citometría de flujo se determinó la frecuencia de las principales subpoblaciones celulares de la FVE. Los resultados obtenidos, expresados como la media  $\pm$  error estándar, demuestran que las células CD45<sup>+</sup> representaron el 21,25%  $\pm$  0,19% del total de las células de la FVE (n= 58). Dentro de la subpoblación celular CD45<sup>+</sup>, el 28,42%  $\pm$  0,21% expresó el CD34 (n= 58), y el 26,00%  $\pm$  0,43% el CD14 (n=29). Los análisis de la subpoblación celular CD14<sup>+</sup> demostraron que el 65,88%  $\pm$  1,98% de las mismas expresaron el CD31 (n=10), el 53,00%  $\pm$  0,60% el CD34 (n=25), el 55,19%  $\pm$  1,93% el KDR (n=10), el 32,31%  $\pm$  1,75% el Tie-2 (n=10) y el 34,50%  $\pm$  5,66% el Flt-1 (n=5).



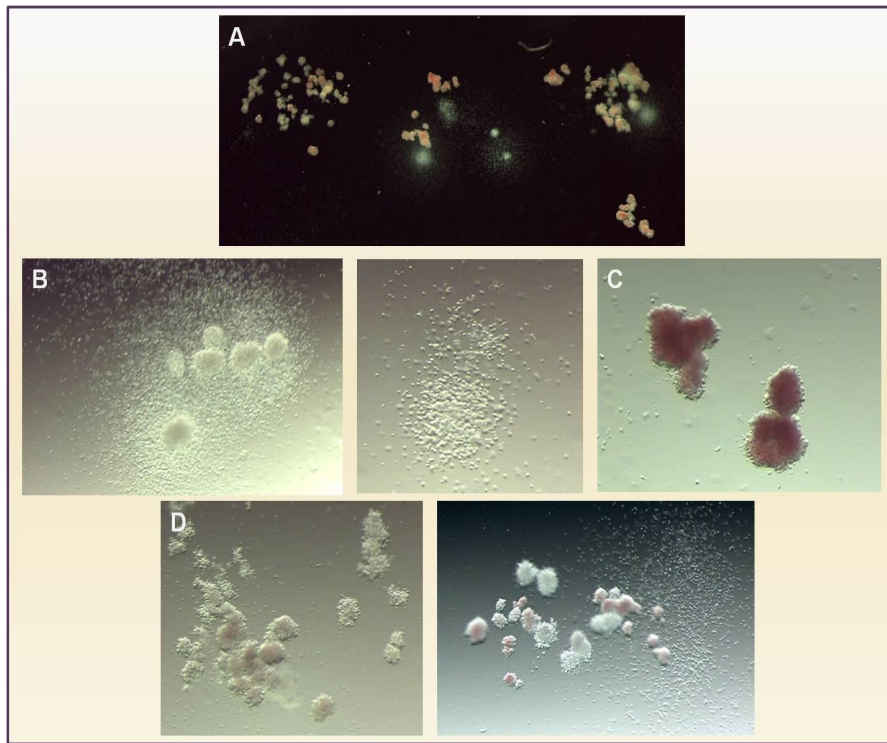
## OBJETIVO 2

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA *IN VITRO* DE LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES CELULARES DE LA FVE DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO

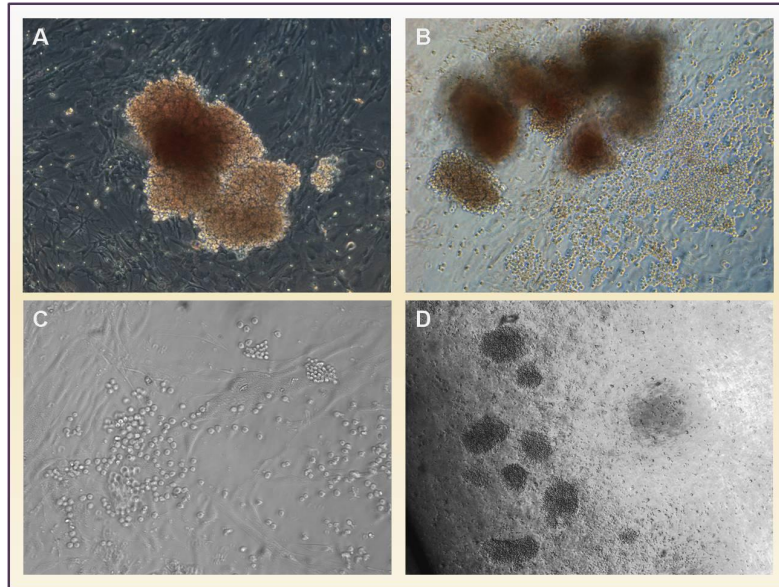
#### *2.1 Estimación de la frecuencia de progenitores hematopoyéticos en las subpoblaciones celulares CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> de la FVE*

Nuestro grupo describió que las células CD45<sup>-</sup> de la FVE tienen capacidad clonogénica [125]. Sin embargo, en humanos, la mayoría de los progenitores hematopoyéticos están contenidos en la población celular CD45<sup>+</sup>. Por ello, se determinó si las células CD45<sup>+</sup> de la FVE también tenían la capacidad de generar CFU.

Tal y como se describe en la Metodología, las células de la FVE se separaron por medios inmunomagnéticos en células CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>. Obtenidas ambas subpoblaciones celulares, se sembraron en un medio semisólido que contiene suero y citocinas hematopoyéticas (*Methocult GF H4435*) y transcurridos entre 14 y 21 días, las CFU se contaron bajo criterios morfológicos. En las Figuras 28 y 29 se muestran imágenes de CFU mieloides y eritroides formadas por las células CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> de la FVE, respectivamente. Es interesante señalar cómo en los cultivos clonogénicos de las células CD45<sup>-</sup>, las CFU aparecen por encima de un estroma naciente formado por las MSC presentes en la muestra.



**Figura 28** Colonias hematopoyéticas generadas por las células  $CD45^+$  de la FVE. (A) Aspecto morfológico de varias BFU-E y una CFU-GM captadas en un mismo campo; amplificación original 0,63x. (B) Aspecto morfológico de dos CFU-GM; amplificación original 4x. (C) BFU-E; amplificación 4x. (D) Aspecto morfológico de dos CFU-GEMM; amplificación original 2x. Fotografías tomadas con una cámara de fotos acoplada a una lupa binocular *Leica MZ6*.



**Figura 29: Colonias hematopoyéticas generadas por las células  $CD45^-$  de la FVE.** (A) BFU-E; amplificación original 10x. (B) CFU-GEMM; amplificación original 10x (C) Aspecto de de una CFU-GM en sus inicios; amplificación original 10x y (D) CFU-GM completamente formada; amplificación 4x. Fotografías tomadas con un microscopio invertido *LEICA DM-IRE2* con cámara de color *DM350FX*.

Tal como se observa en la Tabla 2, el número de CFU por cada  $100 \times 10^3$  células fue aproximadamente 4 veces mayor en la subpoblación celular  $CD45^+$  que en la  $CD45^-$ . Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en la distribución de las CFU (Figura 30). Dado que en humanos la mayoría de los progenitores hematopoyéticos están contenidos en la subpoblación celular  $CD45^+$ , estos resultados sugieren que las células  $CD45^-$  podrían haber estado contaminadas con células  $CD45^+$ . Sin embargo, esta posibilidad es muy remota, pues el grado de pureza de las células aisladas fue siempre superior al 95% en todos los casos (Figura 31).

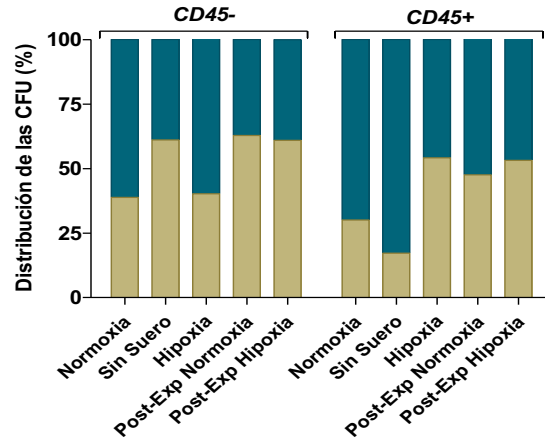


Figura 30: Distribución de las CFU generadas por las células CD45<sup>-</sup> y CD45<sup>+</sup>. Los valores presentados indican la contribución de las colonias mieloides (■) y eritroides (■), expresados en porcentaje con respecto al total de las CFU.

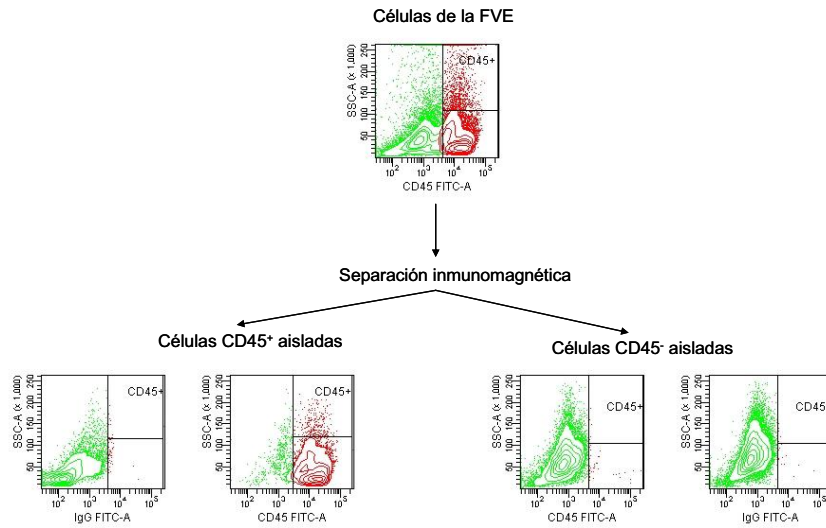


Figura 31. Pureza de las células CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> aisladas mediante métodos inmunomagnéticos. Imágenes de citometría de flujo de las células de la FVE antes de la selección y después de la misma.

		Células recién aisladas				Células cultivadas			
		Normoxia		Hipoxia		Normoxia		Hipoxia	
		Con suero	Sin suero	Con suero	Con suero	Con suero	Con suero	Con suero	Con suero
Células CD45 <sup>+</sup>	CFU	1,53 ± 0,26 (0,06-6,75)	1,55 ± 0,35 (0,80-2,40)	1,79 ± 0,42 (0,75-2,76)	10,13 ± 3,19*†† (4,19-20,13)	13,73 ± 3,93† (3,50-25,0)			
	BFU-E	0,59 ± 0,15*** (0,00-4,25)	0,80 ± 0,05*** (0,78-0,82)	0,72 ± 0,17** (0,30-1,10)	5,93 ± 1,58*†† (2,40-11,15)	7,01 ± 1,39† (2,80-10,77)			
	Colonias mieloides	0,94 ± 0,16*** (0,00-3,18)	0,75 ± 0,35* (0,00-1,60)	1,01 ± 0,25* (0,45-1,66)	4,20 ± 1,67*†† (1,05-8,98)	6,72 ± 3,17† (0,70-18,00)			
Células CD45 <sup>-</sup>	CFU	0,37 ± 0,08 (0,00-1,80)	0,42 ± 0,11 (0,00-1,60)	0,34 ± 0,19 (0,00-0,86)	2,68 ± 0,86†† (0,89-5,30)	7,91 ± 2,77†† (1,42-16,76)			
	BFU-E	0,12 ± 0,03 (0,00-0,63)	0,12 ± 0,05 (0,06-0,75)	0,09 ± 0,06 (0,00-0,25)	2,01 ± 0,99†† (0,00-5,33)	4,70 ± 1,85†† (0,71-9,19)			
	Colonias mieloides	0,25 ± 0,05 (0,00-1,20)	0,30 ± 0,07 (0,06-1,10)	0,25 ± 0,21 (0,00-0,86)	0,67 ± 0,16† (0,00-1,06)	3,21 ± 1,16†† (0,71-7,57)			

**Tabla 2. Número de CFU por 100 x 10<sup>3</sup> células CD45<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup> de la FVE del tejido adiposo humano.** Las células, recién aisladas o cultivadas durante 7 días en medio líquido, se sembraron en medio semisólido conteniendo o no suero, y las CFU se enumeraron. Los valores de las CFU totales corresponden a la suma de las colonias eritroides y mieloides. Las colonias mieloides incluyen las CFU-GM, CFU-M y las CFU-GEMM. Datos expresados como la media ± error estándar. Células aisladas: normoxia con suero (n = 30 - 32), normoxia sin suero (CD45<sup>+</sup>, n = 5; CD45<sup>-</sup>, n = 16), hipoxia (n = 5); células cultivadas (n = 5). Células CD45<sup>+</sup> vs CD45<sup>-</sup>: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001; células cultivadas (CD45<sup>-</sup> o CD45<sup>+</sup>) vs sus correspondientes células aisladas: †p<0.005, ††p<0.0001.

Es bien sabido que el suero contiene factores o componentes que pueden afectar a la proliferación de las células o a la diferenciación de las mismas. Por ello, las células aisladas se sembraron en un medio sin suero. Sin embargo, tal como se observa en la Tabla 2 y en la Figura 30, tanto el número de CFU obtenido como su distribución fue muy similar al obtenido en presencia de suero.

Finalmente, se determinó si las bajas concentraciones de oxígeno afectaban a la capacidad hematopoyética de los progenitores hematopoyéticos contenidos en la FVE. A tal efecto, las células CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> se sembraron en un medio que contenía suero y se incubaron en una atmósfera con un 5% de O<sub>2</sub>. El número de CFU generado por ambas subpoblaciones celulares fue similar en condiciones de normoxia (20% O<sub>2</sub>) y de hipoxia (5% O<sub>2</sub>) (Tabla 2 y Figura 30).

### ***2.2 Expansión de los progenitores hematopoyéticos contenidos en las subpoblaciones celulares CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> de la FVE***

Se sabe que las HSC residen en las zonas más hipóxicas de la médula ósea [135], y que es posible expandirlas *ex vivo* en condiciones de hipoxia [136]. Sin embargo, existe cierta controversia sobre si los progenitores hematopoyéticos se preservan mejor o se pueden expandir en condiciones de hipoxia, probablemente debido a diferencias en las condiciones de cultivo utilizadas [137, 138]. No obstante, la hipoxia es esencial para la proliferación de los progenitores hematopoyéticos embrionarios [139]. Por ello, las células aisladas de la FVE se cultivaron en un medio de cultivo líquido sin suero, óptimo para expandir los progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> [136, 140, 141], y se determinó cómo afectaban las bajas concentraciones de oxígeno a la proliferación de los mismos. Como se muestra en la Tabla 2, tras 7 días



de cultivo en condiciones de normoxia, el número de CFU producido por las células CD45<sup>+</sup> y por las células CD45<sup>-</sup> aumentó aproximadamente unas 7 veces, aunque ello no afectó a la distribución de las CFU (Figura 30). Sin embargo, las células CD45<sup>-</sup>, a diferencia de las CD45<sup>+</sup>, generaron 3,5 veces más CFU cuando el cultivo se realizó en condiciones de hipoxia ( $p < 0,05$ ). Dado que a los 7 días de cultivo en medio líquido, el número total de células disminuyó aproximadamente entre un 5% y un 10% en condiciones de normoxia, y un 25% en condiciones de hipoxia, estos resultados demuestran que hubo una expansión neta de progenitores hematopoyéticos, determinados como CFU, y además sugieren que los progenitores hematopoyéticos contenidos en la subpoblación celular CD45<sup>-</sup> deben ser más primitivos que los contenidos en la subpoblación CD45<sup>+</sup>.

### ***2.3 Determinación de la capacidad hematopoyética de las células CD34<sup>+</sup> de la FVE***

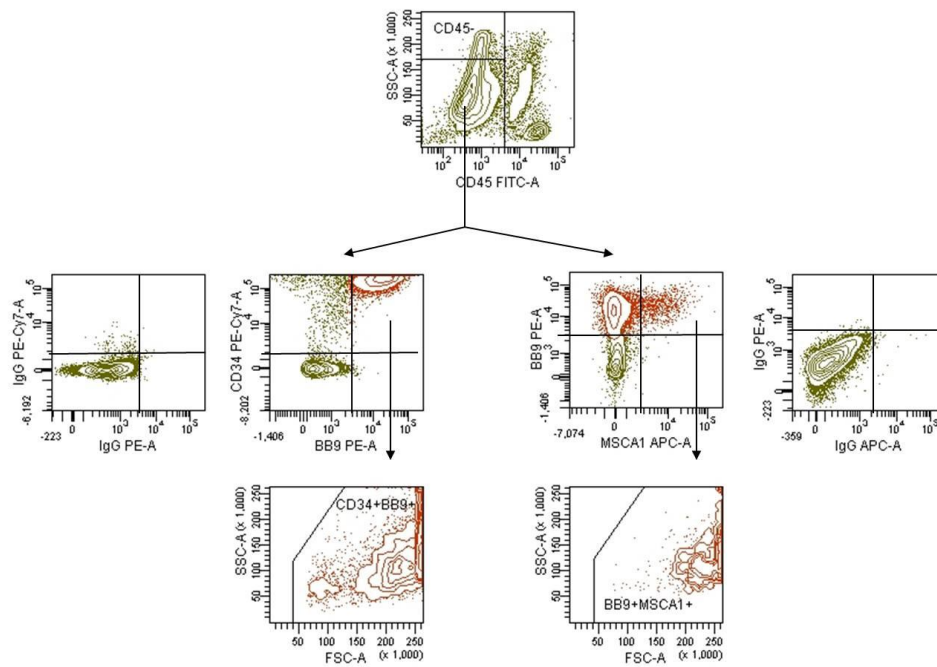
En humanos, a diferencia de lo observado en ratón, el uso de combinaciones de algunos de los miembros de la molécula de señalización de activación del linfocito (SLAM, *signaling lymphocytic activation molecule*) no ha demostrado ser apropiado para identificar las HSC ni los progenitores hematopoyéticos [142, 143], y las estrategias basadas en el aislamiento de las células CD34<sup>+</sup> siguen siendo las más ampliamente utilizadas. Sin embargo, la particular composición de la FVE, altamente enriquecida en células CD34<sup>+</sup> que expresan también el antígeno CD90, fenotipo característico de la célula stem/progenitora hematopoyética [28], hace particularmente difícil la identificación de los progenitores hematopoyéticos.

Nuestros resultados demuestran que las células CD34<sup>+</sup> representaron el 55,50%  $\pm$  0,40% del total de las células ( $n = 55$ ). La mayoría de las

#### Resultados y Desarrollo Argumental

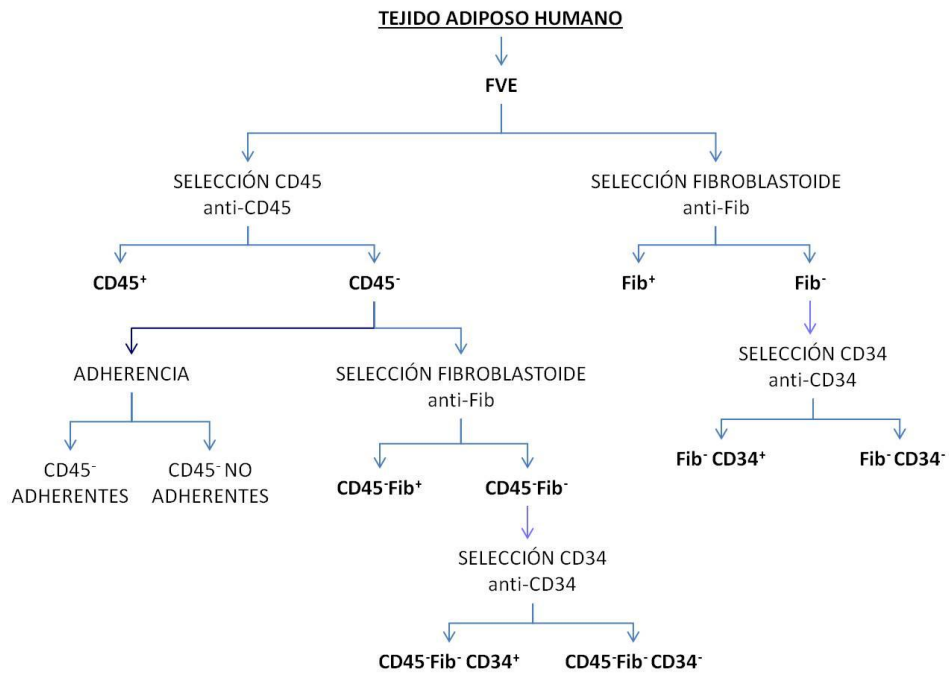
células CD34<sup>+</sup> expresó el CD90 y el CD13 (88,40% ± 0,41%, n = 20 y 85,50% ± 2,37%, n = 7, respectivamente) y una pequeña proporción (21,50% ± 0,21%, n = 50) fue positiva para el CD31. Además, la mayoría de las células CD45<sup>-</sup> expresó el CD34 (76,10% ± 0,41%, n=47) (Figuras 22, 23 y 26.)

Para demostrar que la mayoría de las células CD34<sup>+</sup> correspondía a precursores mesodérmicos, se analizó la co-expresión del BB9 y el MSCA-1. Como se muestra en la Figura 32, prácticamente el 50% de las células CD45<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> expresó el BB9 (47,60% ± 1,44%, n = 14), y los análisis de FSC y SSC demostraron que las células CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> no constituían una población homogénea, pues incluía células grandes y granulares (alto FSC/SSC) y también células de menor tamaño y baja granularidad (bajo FSC/SSC). Además, una proporción variable de las células CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> co-expresó el MSCA-1 (33% ± 3,5%, n = 5). Como las células BB9<sup>+</sup>MSCA-1<sup>+</sup> exhibieron los mayores valores de FSC/SSC, la co-expresión del BB9 y el MSCA-1 debe reconocer a las células del estroma mesenquimatoso, mientras que el fenotipo BB9<sup>+</sup>MSCA-1<sup>-</sup> debe identificar las células mesodérmicas más primitivas y probablemente también los progenitores hematopoyéticos.



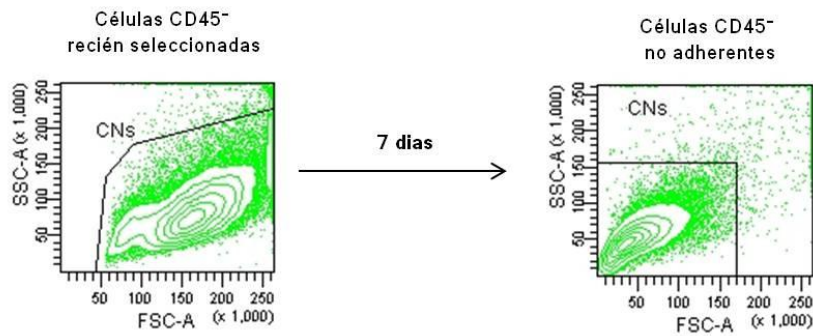
**Figura 32.** Las células  $CD34^+$  de la FVE son en su mayoría de origen estromal. Las células de la FVE se marcaron con el anticuerpo anti- $CD45$  y las células  $CD45^-$  se analizaron para determinar la co-expresión del  $CD34$  con los antígenos  $BB9$  y  $MSCA-1$ . En la izquierda de la figura se muestran las células  $CD34^+BB9^+$ , representadas en rojo, y sus características físicas de  $FSC$  y  $SSC$ . En la derecha de la figura se muestra la expresión del  $MSCA-1$  en las células  $CD34^+BB9^+$ , así como las características de  $FSC/SSC$  de las células  $BB9^+MSCA1^+$ . Los controles isotípicos se muestran a ambos lados de la figura.

Dado que una gran mayoría de las células  $CD34^+$  tenía un fenotipo de  $MSC$ , se diseñaron varias estrategias (descritas en la Metodología), que nos permitieran aislar distintas subpoblaciones de células  $CD34^+$  (Figura 33), y así determinar cuál de ellas tenía actividad hematopoyética.



**Figura 33. Subpoblaciones celulares aisladas en las distintas estrategias utilizadas.**

En primer lugar, para determinar si la población  $CD45^-$  estromal contenía progenitores con actividad hematopoyética, tomamos en consideración una de las propiedades físicas más característica de las MSC, que es su adherencia al plástico del material de cultivos. Así, se sembraron las células  $CD45^-$  en DMEM con un 5% de FBS, y tras 7 días de cultivo se recogieron las células adherentes y las no adherentes. Tal como se observa en la Figura 34, a los 7 días de cultivo las células  $CD45^-$  no adherentes al plástico, eran las de menor tamaño y granularidad. Como era de esperar, las células adherentes carecieron de actividad hematopoyética, mientras que la capacidad clonogénica de las células no-adherentes aumentó  $13,2 \pm 1,7$  veces ( $n = 3$ ) respecto a la actividad exhibida por las células  $CD45^-$  recién aisladas.



**Figura 34: Imagen por citometría de flujo de las células CD45<sup>-</sup> recién aisladas y de las células CD45<sup>-</sup> no adherentes a los 7 días de cultivo.**

En otra serie de experimentos, las células de la FVE se separaron en base a la expresión del antígeno fibroblasto [126, 127] en células Fib<sup>+</sup> y Fib<sup>-</sup>. En estas condiciones las células Fib<sup>+</sup> representaron aproximadamente el 10% del total de las células. Tal como se observa en la Figura 35, virtualmente todas las células aisladas Fib<sup>+</sup> expresaron el CD34, y más del 70% de las células Fib<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> expresó el BB9. Los ensayos clonogénicos demostraron que las células Fib<sup>-</sup> generaron el  $99,28 \pm 1,25$  del total de las CFU generadas por las células de la FVE ( $n = 6$ ), mientras que una mínima actividad hematopoyética residual ( $0,72\% \pm 1,25\%$  del total de las CFU) fue generada por las células Fib<sup>+</sup>, probablemente debida a la presencia de células CD45<sup>+</sup> que se recogieron durante el proceso de selección (Figura 35).

A continuación, las células Fib<sup>-</sup> se separaron en las subpoblaciones celulares Fib<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup> y Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>, que constituyeron aproximadamente el 20%-25% y el 70%-80% de las células Fib<sup>-</sup>, respectivamente. Los ensayos para la enumeración de progenitores hematopoyéticos demostraron que las células Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> generaron el  $94,32\% \pm 2,03\%$  del total de CFU producidas por la población celular Fib<sup>-</sup> ( $n = 6$ ), mientras que el resto de las CFU (5,69%

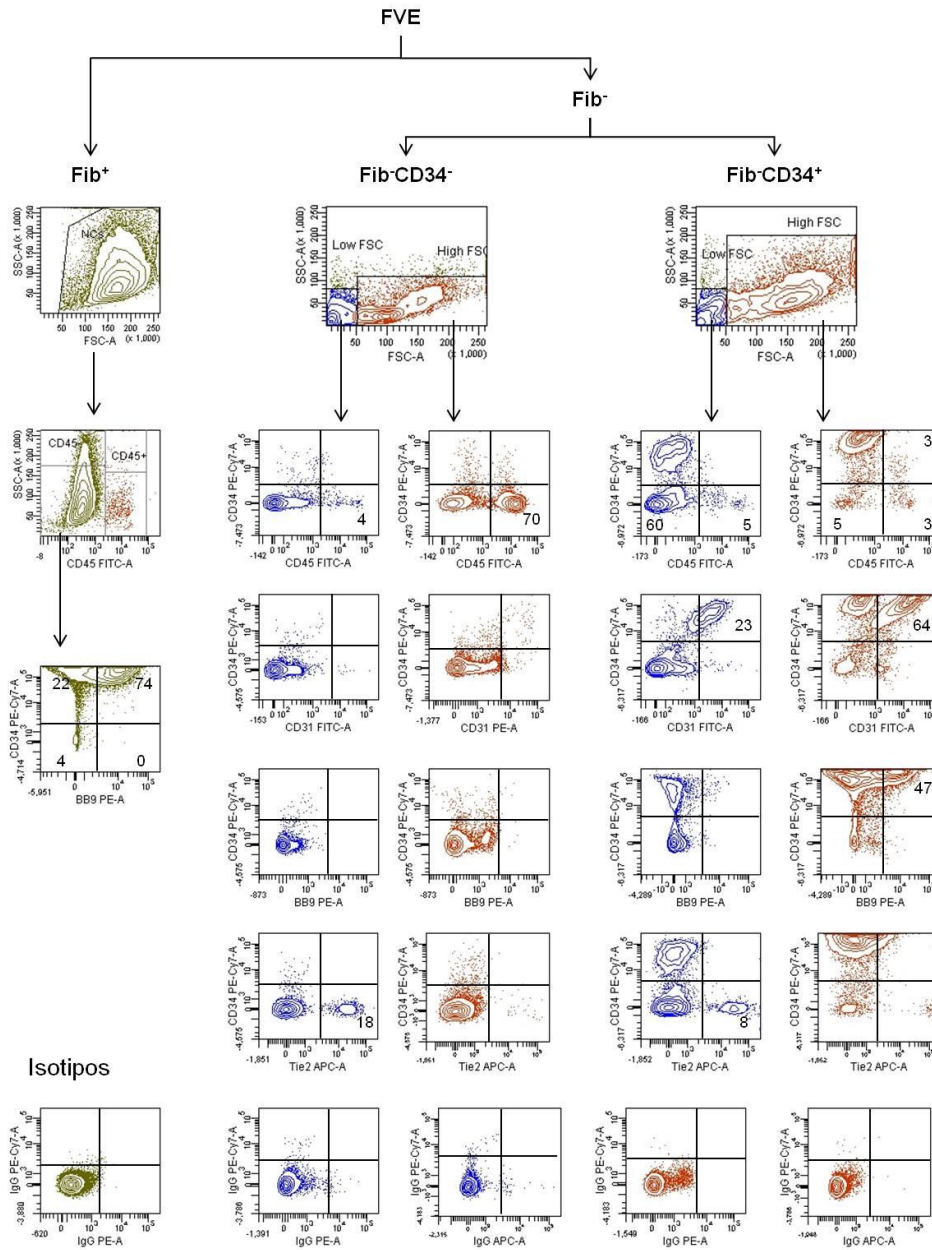
$\pm 2,03\%$ ) lo aportaron las células  $\text{Fib}^- \text{CD34}^-$ , una población enriquecida en células hematopoyéticas  $\text{CD45}^+ \text{CD34}^-$  (Figura 35).

Alternativamente, las células de la FVE se separaron en base a la expresión del antígeno CD45 y posteriormente en base a la expresión del antígeno fibroblasto. Como era de esperar, las células  $\text{CD45}^- \text{Fib}^+$  no generaron CFU, mientras que la capacidad clonogénica de las células  $\text{CD45}^- \text{Fib}^-$  aumentó en unas  $1,70 \pm 0,16$  veces respecto al conjunto de las células  $\text{CD45}^-$ . A continuación las células doblemente negativas  $\text{CD45}^- \text{Fib}^-$  se separaron en base a la expresión de la molécula CD34, y esta estrategia permitió demostrar que solo las células  $\text{CD45}^- \text{Fib}^- \text{CD34}^+$  tenían capacidad de generar CFU.

Nuestro grupo había demostrado que la capacidad hemangioblástica de las células  $\text{CD45}^-$  de la FVE residía en unas células de muy bajo FSC y SSC [125]. Por lo tanto, con el fin de fenotipar las células contenidas en la subpoblación celular  $\text{Fib}^-$  que presentaran estas características, se usó un valor bajo para el umbral de FSC (FSC threshold de 5000), que en combinación con el colorante vital 7-AAD, permitiera analizar las células viables de muy pequeño tamaño. A continuación, tal como se muestra en la Figura 35, las células aisladas  $\text{Fib}^- \text{CD34}^+$  y  $\text{Fib}^- \text{CD34}^-$  se analizaron atendiendo a sus características de FSC y SSC.

La citometría de flujo demostró que la pureza de las células recogidas en la ventana de "Alto FSC" fue muy alta, de hecho, el porcentaje de células  $\text{CD34}^+$  en la subpoblación  $\text{Fib}^- \text{CD34}^-$  fue siempre inferior al 0,5%, mientras que el porcentaje de las células  $\text{CD34}^-$  recogidas en la población  $\text{Fib}^- \text{CD34}^+$  rara vez excedió del 5%-8%. Sin embargo, se pudo observar que la subpoblación celular  $\text{Fib}^- \text{CD34}^+$  contenida en la ventana de "Bajo FSC"

contenía una proporción variable de células que carecían de la expresión del CD34.



**Figura 35. Análisis por citometría de flujo de las células aisladas de la FVE del tejido adiposo humano.** Las células de la FVE se separaron por métodos inmunomagnéticos siguiendo el diagrama esquemático de la figura. Las células Fib<sup>+</sup> se marcaron con el anticuerpo anti-CD45 y se determinó la expresión de los antígenos CD34 y BB9 en

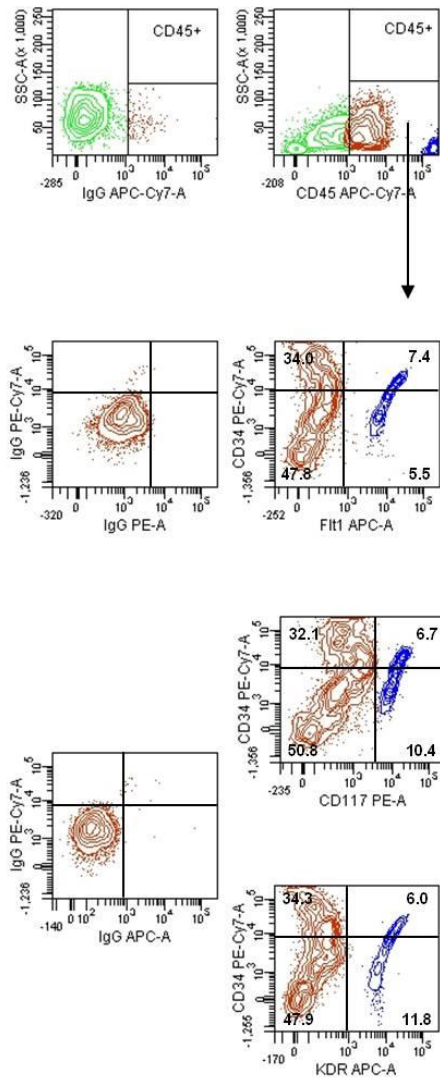
## Resultados y Desarrollo Argumental

las células CD45<sup>-</sup>. Las células aisladas Fib<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup> y Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> se analizaron de manera independiente y atendiendo a las características de FSC y SSC para determinar la expresión de CD34, CD45, CD31, Tie-2 y BB9. Las células contenidas en el umbral bajo de FSC representaron aproximadamente el 35% y el 45% del total de las células Fib<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup> y Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>, respectivamente. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células expresando los antígenos seleccionados. En la figura se muestran los controles isotípicos.

Muchas de las células CD34<sup>+</sup>, con independencia de sus características citométricas de FSC, expresaron el antígeno CD31, lo que indica la presencia de células endoteliales o progenitores endoteliales en la FVE. Sin embargo, la expresión del BB9 pareció estar más restringida a las células CD34<sup>+</sup> con un alto FSC. Como era de esperar, ni el CD31, ni el BB9 se expresaron en las células Fib<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>. Es importante señalar la presencia de una población discreta de células de muy pequeño tamaño, que siendo negativas para CD34, exhibieron una alta expresión de Tie-2, el receptor de la angiopoietina (Figura 35).

Aunque estos análisis no permitieron identificar una población discreta de progenitores hematopoyéticos, si se pudo apreciar la presencia de células CD34<sup>+</sup> en ambas subpoblaciones celulares CD45<sup>-</sup> y CD45<sup>+</sup> con una intensidad de fluorescencia intermedia, y que probablemente deben contener los progenitores hematopoyéticos de la FVE. Por otra parte, las únicas células que expresaron los antígenos CD117, Flt-1 y KDR, marcadores típicos de HSC y progenitores hematopoyéticos primitivos [144-146], estuvieron contenidas en la subpoblación celular CD45<sup>+</sup>, pero a diferencia de los progenitores hematopoyéticos que tienen una débil o nula expresión de CD45, estas células fueron fuertemente positivas para este antígeno (Figura 36), por lo que deben ser mastocitos o células cebadas.

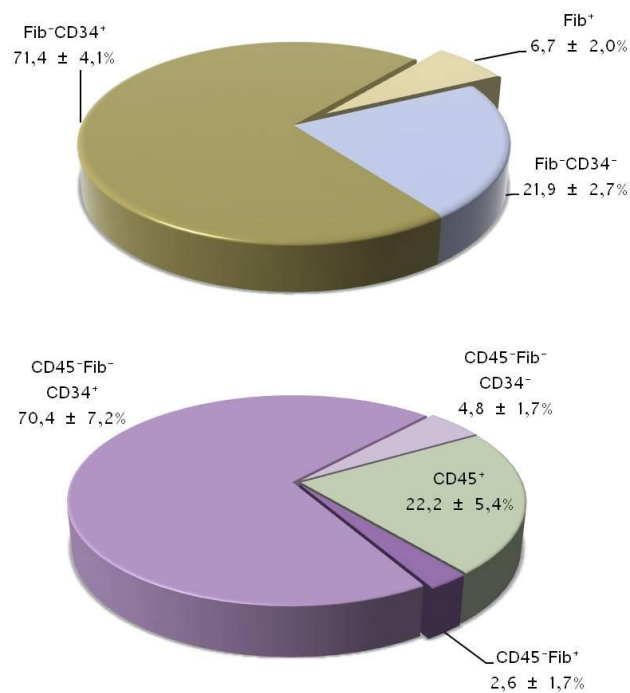




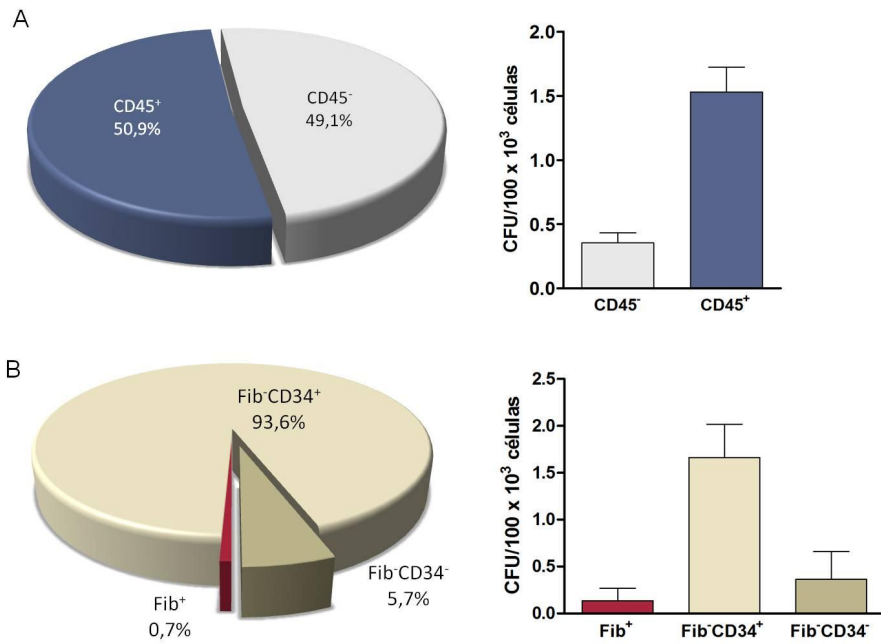
**Figura 36. Expresión de Flt-1, CD117 y KDR en las células de la FVE.** En algunas muestras de tejido adiposo humano se pudo observar la presencia de células con una elevada expresión de CD45, representadas en azul, que co-expresaron los antígenos CD34, Flt-1, CD117 y KDR. Los números en los cuadrantes representan el porcentaje de células positivas para los antígenos seleccionados.

#### 2.4 Distribución de la celularidad y la actividad hematopoyética en la FVE

Los resultados obtenidos han permitido hacer una estimación de la contribución de las distintas subpoblaciones celulares a la composición de la FVE del tejido adiposo humano (Figura 37), y a la actividad hematopoyética en la misma (Figura 38).



**Figura 37. Distribución de las subpoblaciones celulares de la FVE.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar y corresponden a una  $n = 10-35$ .



**Figura 38: Distribución de la actividad hematopoyética en la FVE.** Los resultados indican la contribución de las distintas subpoblaciones celulares a la actividad hematopoyética de la FVE, seleccionadas en base a la expresión del antígeno CD45 (A) y a los antígenos Fibroblasto y CD34 (B). Las figuras de la izquierda muestran la actividad hematopoyética de las células seleccionadas en porcentaje. Las figuras de la derecha indican el número de CFU generadas por 100 x 10<sup>3</sup> células, estando los resultados expresados como la media ± error estándar. Los datos del panel A corresponden a los datos presentados en la Tabla 2. Los datos del panel B corresponden a una n = 6.



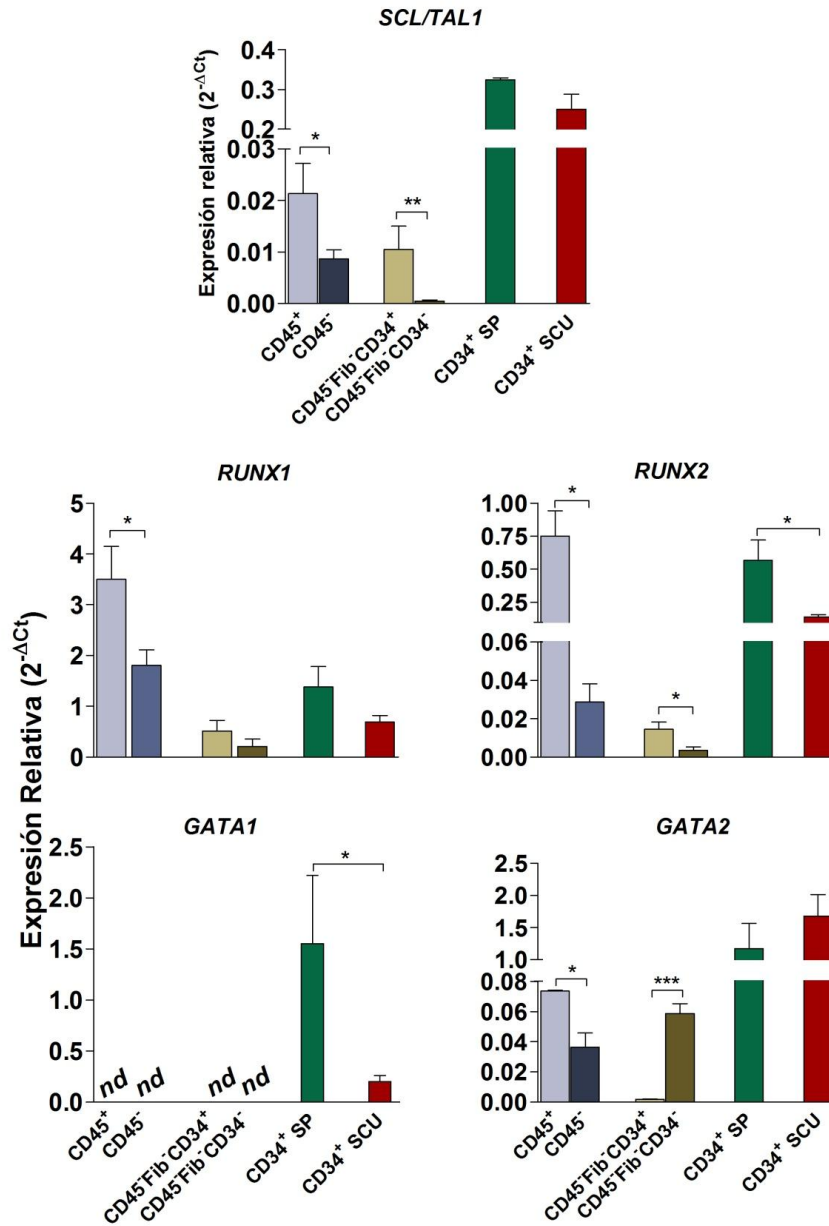
### OBJETIVO 3

#### DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HEMATOPOYÉTICOS EN LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES CELULARES DE LA FVE DEL TEJIDO ADIPOSEO HUMANO

##### *3. 1. Expresión de los genes implicados en el proceso de la hematopoyesis*

Para caracterizar mejor la actividad hematopoyética de las células de la FVE, se analizó, mediante RT-PCR, la expresión de los principales genes implicados en el desarrollo de la hematopoyesis.

Tal como se observa en la Figura 39, los principales factores de transcripción, incluyendo *SCL/TAL1*, *GATA2*, *RUNX1* y *RUNX2* se expresaron a niveles significativamente más altos en las células  $CD45^+$  que en las células  $CD45^-$ , probablemente como resultado del mayor contenido en progenitores hematopoyéticos en esa subpoblación celular. Sin embargo, *GATA1*, un factor de transcripción tardío, directamente implicado en el proceso de eritropoyesis [147] no se detectó ni en las células  $CD45^+$  ni en las  $CD45^-$ , a pesar de que todos los ensayos clonogénicos demostraron la existencia de progenitores eritroides.



**Figura 39. Análisis de la expresión de los factores de transcripción involucrados en la hematopoyesis.** Las subpoblaciones celulares de la FVE, así como las células CD34<sup>+</sup> de SCU y SP se aislaron mediante métodos inmunomagnéticos y se utilizaron para los análisis de la expresión génica mediante RT-PCR. El nivel de los transcritos fue normalizado frente al gen de referencia *GAPDH*. nd: no detectado. CD34<sup>+</sup> de SCU y de SP (n=6-8); Subpoblaciones celulares de la FVE: CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> (n = 6), CD45<sup>-</sup>Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>Fib<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup> (n = 4). Valores de significancia: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Cuando se analizaron las células  $CD45^-Fib^-CD34^+$  y  $CD45^-Fib^-CD34^-$ , el patrón de expresión génica obtenido demostró que la subpoblación celular que contenía las células  $CD34^+$  tenía un mayor nivel de expresión de los genes *SCL/TAL1* y *RUNX2*, mientras que *GATA2* se expresó a niveles significativamente más altos en la subpoblación celular  $CD34^-$ . Por contra, no hubo diferencias en el nivel de expresión de *RUNX1*.

A continuación, se determinó la expresión de estos genes en los progenitores hematopoyéticos aislados de SCU y de SP. Como se observa en la Figura 39, el nivel de ARNm de los genes *GATA1* y *RUNX2* fue significativamente más alto en las células  $CD34^+$  de adulto que en las neonatales. Dado que las células  $CD34^+$  incluyen las HSC y los progenitores hematopoyéticos, estas diferencias en el nivel de expresión pueden ser debidas a un mayor contenido en progenitores hematopoyéticos no quiescentes en las células  $CD34^+$  de SP de adulto [148]. Sin embargo, los niveles de *SCL/TAL1* y *GATA2* fueron similares, y aunque el nivel de expresión de *RUNX1* fue mayor en las células  $CD34^+$  de adulto que en las de SCU, no hubo diferencias significativas.

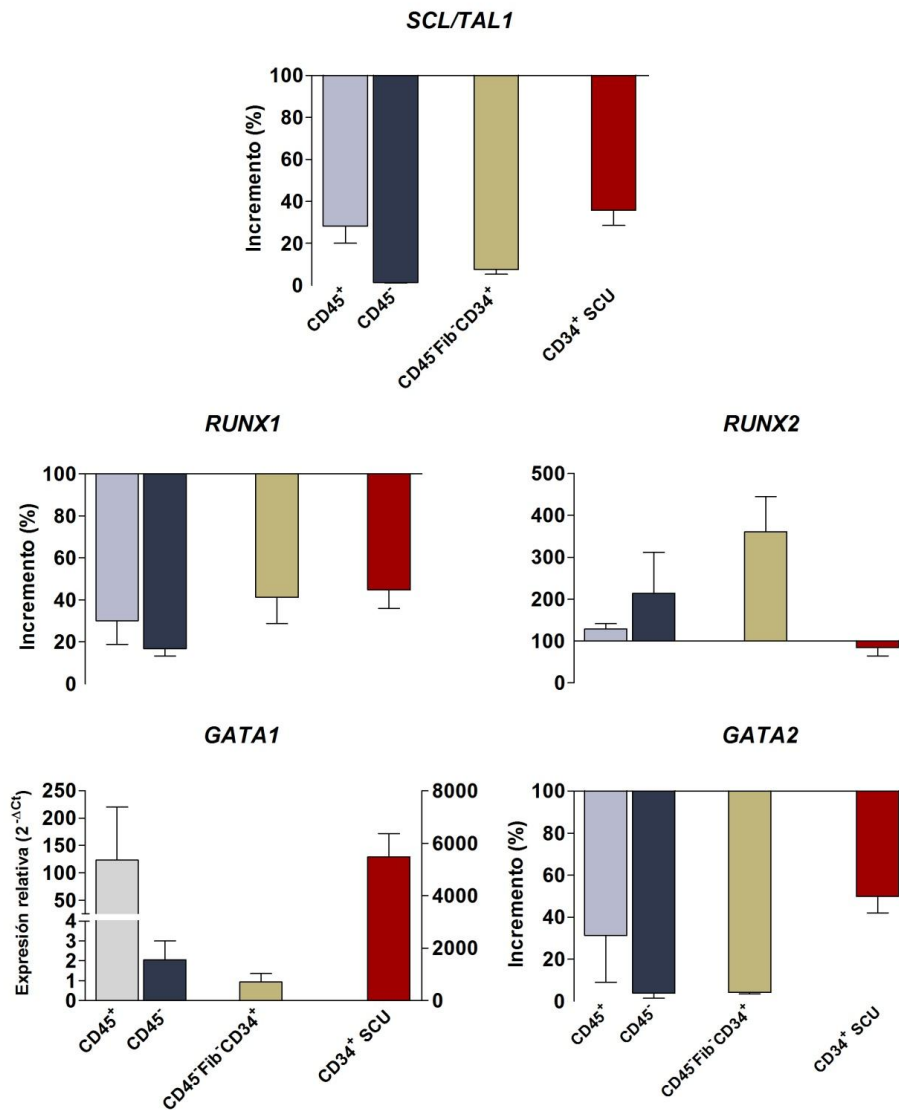
Finalmente, se comparó el nivel de expresión génica de las células  $CD45^+$  y  $CD45^-$  de la FVE con el de los progenitores hematopoyéticos procedentes de SCU y SP. Los resultados obtenidos demuestran que las células hematopoyéticas  $CD34^+$  expresaron aproximadamente unas 10 o 20 veces más *SCL/TAL1*, y unas 20 o 40 veces más *GATA2* que las células  $CD45^+$  o  $CD45^-$  de la FVE, respectivamente. Sin embargo, el nivel de expresión de *RUNX1* en las células de la FVE fue similar o superior al de las células  $CD34^+$ . Por último, el nivel de transcritos de *RUNX2* en las células  $CD45^+$  de la FVE y en las células  $CD34^+$  de la SP fue similar. Sin embargo, las células  $CD45^-$  de la FVE expresaron niveles de *RUNX2* más bajos que los

progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> de SCU.

Se ha demostrado que la expansión de los progenitores mieloides está asociada a cambios en el nivel de expresión de los factores de transcripción [149]. Por ello y con el fin de determinar el cambio en el patrón de expresión génica, las células CD45<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>, que previamente habían demostrado tener la capacidad de formar CFU, así como los progenitores CD34<sup>+</sup> de la SCU, se cultivaron en un medio líquido, óptimo para la expansión de progenitores hematopoyéticos, y transcurridos 7 días se determinó el nivel de expresión de los genes seleccionados en las muestras cultivadas.

Tal como se observa en la Figura 40, la expansión de los progenitores hematopoyéticos fue acompañada de una sobre-expresión, o de una inducción de *GATA1* en las células CD34<sup>+</sup> de SCU o en las células aisladas de la FVE, respectivamente. Sin embargo, estas condiciones de cultivo indujeron un descenso en el nivel de expresión de los genes *SCL/TAL1*, *RUNX1* y *GATA2* en todas las muestras analizadas, probablemente indicando un consumo de las HSC. Por otra parte, mientras el nivel de expresión de *RUNX2* no se modificó en las células CD34<sup>+</sup> de SCU, ni en las células CD45<sup>+</sup> de la FVE tras los 7 días de cultivo, aumentó en las células CD45<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> de la FVE.





**Figura 40. Cambios en la expresión de los factores de transcripción hematopoyéticos.**

Las células CD34<sup>+</sup> de SCU, y las células CD45<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> de la FVE se cultivaron en un medio líquido libre de suero y conteniendo citocinas hematopoyéticas de acción temprana durante 7 días. A continuación se extrajo el ARN que se utilizó para determinar los cambios en el nivel de expresión génica mediante RT-PCR. El nivel de los transcritos se normalizó frente al gen *GAPDH*. El incremento de expresión, expresado en porcentaje, se determinó calculando el ratio entre el nivel de expresión obtenido en las células cultivadas y en las células aisladas. CD34<sup>+</sup> de SCU (n = 5); Subpoblaciones celulares de la FVE: CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> (n = 6), CD45<sup>-</sup>Fib<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> (n = 4).

El principal objetivo de este trabajo era demostrar si los progenitores hematopoyéticos de la FVE procedían del propio tejido adiposo, o del torrente circulatorio. Dado que el tejido adiposo no es hematopoyético en origen, existe la posibilidad de que estos progenitores sean de hecho progenitores hematopoyéticos circulantes, que han sido recogidos durante el proceso de digestión de la muestra o bien que, procedentes de la médula ósea, hayan anidado en el tejido. Existen datos que sustentan esta hipótesis. Así, se ha descrito que el tejido adiposo epididimal del ratón contiene células hematopoyéticas  $\text{Lin}^- \text{CD45}^+ \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$ , que aumentaron tras movilización con G-CSF [150]. Además, el tejido adiposo expresa CXCL12 y SCF [151], dos moléculas implicadas en el mantenimiento y reclutamiento de las HSC y progenitores hematopoyéticos en su nicho vascular [152, 153], y por lo tanto podrían participar en la formación de un nicho apropiado para los progenitores hematopoyéticos circulantes. Por otra parte, se ha demostrado que las MSC derivadas del tejido adiposo, al igual que las derivadas de la médula ósea [58, 154, 155] son capaces de soportar la hematopoyesis [156-158] y de recuperar la hematopoyesis en animales irradiados [151]. Sin embargo, también existe la posibilidad de que los progenitores hematopoyéticos deriven de las células hemangioblásticas del propio tejido [125].

Es un hecho conocido que las células hematopoyéticas y las endoteliales se desarrollan a partir de las células  $\text{Flk1}^+$  del mesodermo [159, 160], aunque todavía existe cierta controversia sobre si se originan de un progenitor común, el hemangioblasto [121], o de un endotelio hemogénico [161, 162]. Recientemente, Lancrin y cols. [163] demostraron que estas dos células primitivas estaban íntimamente relacionadas, y que el hemangioblasto  $\text{Flk1}^+ \text{brachyury}^+$  genera las células hematopoyéticas a través de la formación de un endotelio hemogénico  $\text{Tie2}^{\text{high}} \text{c-kit}^+ \text{CD41}^-$ , que actúa de intermediario.

Además, estos autores demostraron que las células más primitivas que se desarrollan de las colonias de blastos (hemangioblastos) tenían el fenotipo  $Tie2^{+}c\text{-kit}^{-}CD41^{-}$  y expresaban altos niveles de *Gata2*, y lo que es más importante, mientras *Scf* fue necesario para la generación de las colonias de blastos y el endotelio hemogénico, *Runx1* fue indispensable para la generación de las células hematopoyéticas definitivas. Por otra parte, se ha descrito que GATA2, modulando la expresión de *Scf*, indujo la diferenciación de las células del mesodermo  $Flk1^{+}$ , a través de los hemangioblastos  $Flk1^{+}Scf^{+}$ , en células hematopoyéticas o endoteliales [164].

*GATA1* y *GATA2* son esenciales en la hematopoyesis embrionaria y adulta [165]. Sin embargo, en la hematopoyesis primitiva, la expresión de *GATA1* y *GATA2* no solo se solapa [166], sino que la activación tardía de los transgenes *Gata1*, *-2*, y *-3* puede rescatar el fenotipo *Gata1*-null, evidenciando así que la regulación espacio-temporal de los factores *Gata* es fisiológicamente más importante que su propia identidad [167]. Ya en el periodo postnatal, *GATA2* es necesario para el mantenimiento y expansión de las HSC [168, 169]. Además, se ha demostrado que sus niveles de expresión son más altos en las HSC quiescentes [170] y que puede conferir quiescencia a los progenitores hematopoyéticos de SCU  $CD34^{+}CD38^{-}$ , tanto *in vitro* como *in vivo* [171].

Por lo tanto, es razonable asumir que la alta expresión de *GATA2* en las células de la FVE, pueda inducir quiescencia en los precursores hematopoyéticos residentes en este tejido. Además, las células  $CD45^{-}Fib^{-}CD34^{-}$  expresaron niveles de *GATA2* mucho más altos que los de sus complementarias  $CD45^{-}Fib^{-}CD34^{+}$ , pero a diferencia de ellas no tuvieron capacidad de generar CFU, dada la falta de expresión del antígeno *CD34*

[32, 172]. Por lo tanto, es posible que las células  $CD45^-Fib^-CD34^-$ , enriquecidas en células  $Tie-2^+$ , contengan células bipotentes o precursores endoteliales. Cualquiera de las dos posibilidades puede explicar el perfil génico obtenido.

Adicionalmente, los resultados obtenidos en los ensayos clonogénicos demostraron que el número de CFU generado por las células  $CD34^+$  de la SCU fue de 40 CFU/100 células  $CD34^+$ , lo que indicaría que la frecuencia de progenitores hematopoyéticos en esta población celular es de  $2 \times 10^4$  a  $8 \times 10^4$  veces superior a la exhibida por las células  $CD45^+$  o  $CD45^-$  de la FVE, respectivamente. Sin embargo, el nivel de los transcritos de *SCL/TAL1* y *GATA2*, dos genes expresados por las HSC y los progenitores hematopoyéticos [168-173], en las muestras derivadas de tejido hematopoyético y adiposo difirieron solo en un orden de magnitud, pero no se detectó expresión de *GATA1*.

Dado que los progenitores hematopoyéticos contenidos en la FVE son capaces de generar BFU-E, a pesar de que no se detectara expresión de *GATA1*, nuestros resultados sugieren que deben ser ontogénicamente más primitivos que los progenitores hematopoyéticos circulantes, o bien, que no derivan de la médula ósea.

Por otra parte, es interesante señalar que *RUNX1*, no solo es un marcador temprano de célula endotelial y mesenquimal en los sitios de emergencia de las HSC [174, 175], sino que es esencial en la hematopoyesis definitiva [163, 176]. Sin embargo, aunque en adultos se expresa en las HSC y en las células progenitoras hematopoyéticas [177] su función no parece ser requerida para el mantenimiento de las HSC [178]. En cuanto a *RUNX2*,

otro miembro de la familia RUNX, aunque esencial en el desarrollo del esqueleto, su expresión es elevada en las HSC y en los progenitores hematopoyéticos tempranos, disminuyendo a medida que avanza el proceso de diferenciación, de manera que niveles altos y sostenidos pueden inducir una leucemia mieloide. [179, 180]. Además, se ha sugerido que Runx1 y Runx2 se regulan mutuamente en los progenitores hematopoyéticos [180]. Por lo tanto, es posible que los altos niveles de *RUNX1* en las células de la FVE sean un marcador de MSC, pero también de célula mesodérmica comprometida a la formación de células hematopoyéticas y endoteliales.

Aunque no hemos confirmado que los niveles de ARNm se correlacionen directamente con los niveles de proteína para estos genes, los resultados obtenidos sugieren diferencias potencialmente importantes en la regulación de la hematopoyesis entre los progenitores hematopoyéticos de la FVE y los circulantes.



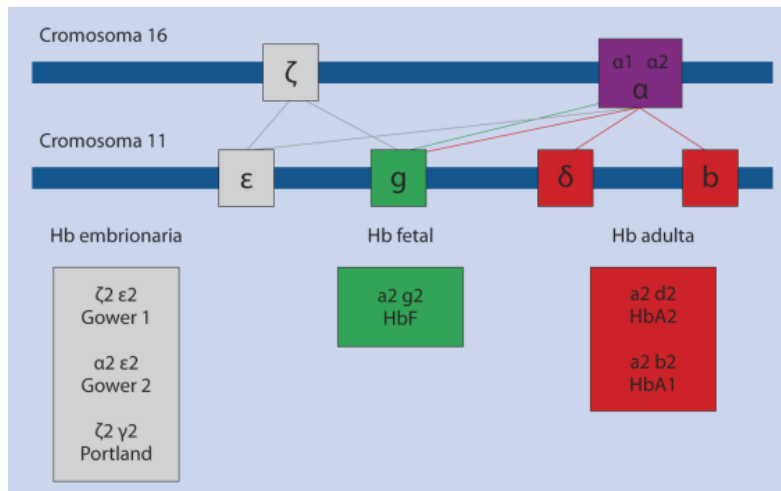
## OBJETIVO 4

### DETERMINACIÓN DE LA ONTOGENIA DE LOS PROGENITORES ERITROIDES CONTENIDOS EN LA FVE DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO

#### *4.1. Ontogenia de la Eritropoyesis*

En humanos, la eritropoyesis primitiva se origina en el mesodermo extraembrionario, siendo detectada en el saco vitelino a los 14-19 días de la concepción, y persiste en este órgano hasta la novena semana de gestación. Se sabe, desde hace mucho tiempo, que estos eritrocitos primitivos experimentan un cambio o “switch” parcial de la hemoglobina. En la semana 5ª, los eritroblastos sintetizan principalmente Hb Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), y entre las semanas 6ª a 8ª también sintetizan Hb Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) [181]. La eritropoyesis definitiva, que tiene lugar en la región aorta-gónada-mesonefros del propio embrión, ya se detecta en el hígado fetal en la semana sexta de la gestación [182]. Los eritroblastos en este órgano expresan las globinas  $\zeta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ , y pequeñas cantidades de  $\beta$ , pero rápidamente los genes de las globinas  $\zeta$  y  $\varepsilon$  son silenciados, mientras que los de la  $\alpha$  y la  $\gamma$  se continúan expresando hasta el nacimiento. En este punto, la eritropoyesis en la médula ósea, que ya era detectable en la 11ª semana de gestación [183, 184], se convierte en el principal sitio de la eritropoyesis, y la expresión del gen de la globina  $\beta$ , que había ido aumentando progresivamente durante la gestación, reemplaza casi completamente al de la globina  $\gamma$ .

Los genes de las distintas globinas se encuentran agrupados en dos locus diferentes: el “locus de la globina  $\alpha$ ” y el “locus de la globina  $\beta$ ” que se encuentran en los cromosomas 16 y 11, respectivamente (Figura 41).



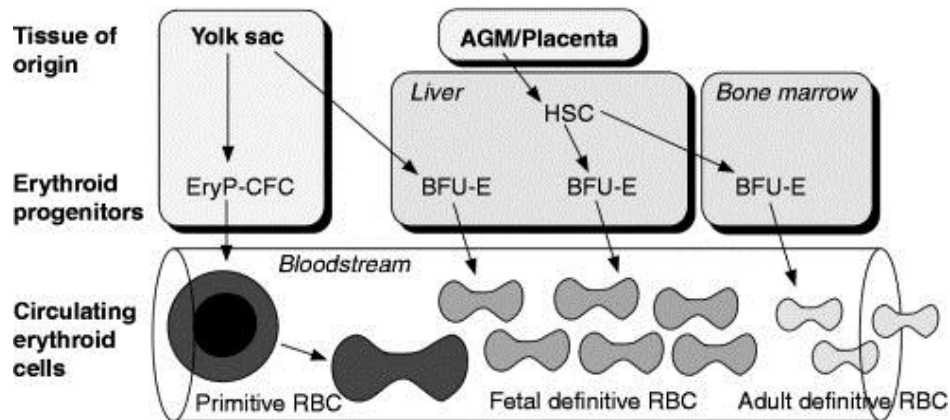
**Figura 41. Representación esquemática de los locos de las globinas.**

En cada uno de los sitios anatómicos, la interacción entre las células del estroma y las HSC participan en la regulación de la proliferación y diferenciación de estas últimas [185]. Además de todos estos cambios, hay enormes diferencias en la concentración de oxígeno durante el desarrollo. En el embrión, el oxígeno es obtenido a través del fluido intersticial materno y en el feto, vía placenta, donde no aumenta hasta la semana 20ª de gestación. Después del nacimiento, la tensión de oxígeno aumenta rápidamente en los pulmones del recién nacido.

Aunque la eritropoyesis ha sido un proceso muy estudiado, el desarrollo de los cultivos de las células stem embrionarias humanas está permitiendo profundizar en el estudio de todos los eventos celulares y moleculares de este proceso altamente regulado [186-189]. Asimismo, la posibilidad de diferenciar los progenitores hematopoyéticos  $CD34^+$  en células eritroides, permite el estudio desde las BFU-E hasta las CFU-E, y eventualmente su maduración en eritroblastos, normoblastos, reticulocitos y finalmente en eritrocitos enucleados [190]. Lo más interesante de estos estudios es que no solo



permiten una recapitulación del proceso *in vivo*, sino que el perfil de las hemoglobinas en las células generadas en cultivo refleja la ontogenia de las HSC y los progenitores eritroides o BFU-E (Figura 42) [191-194].



**Figura 42. Modelo simplificado de la ontogenia eritroide en el embrión de mamífero.** EryP-CFC: progenitores eritroides primitivos; BFU-E: progenitores eritroides; RBC: eritrocitos; AGM: región aorta-gónada-mesonefros. Imagen tomada de Palis J. *Curr Opin Hematol* 2008;15:155-161.

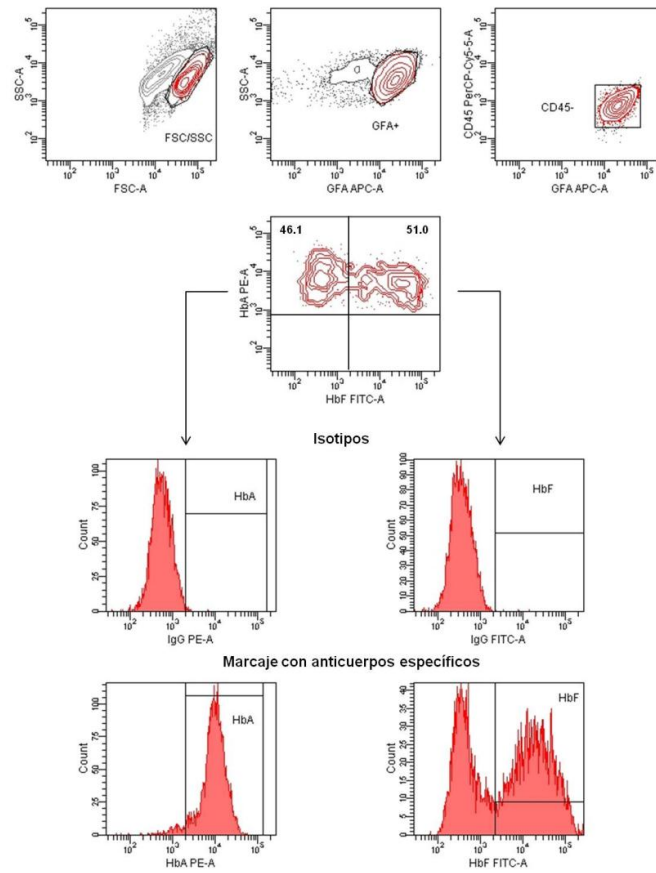
#### 4.2. Estudio de los progenitores eritroides

Los resultados obtenidos a nivel celular y molecular demuestran la presencia de progenitores hematopoyéticos en la FVE del tejido adiposo humano, y aunque su firma molecular difiere de la de los progenitores circulantes, ninguna de las pruebas realizadas aporta suficiente información sobre su origen u ontogenia. Como se ha comentado anteriormente [150], se ha sugerido que el tejido epididimal del ratón puede ser un reservorio de progenitores hematopoyéticos. Huelga decir que es inconcebible la realización de este tipo de experimentación en humanos. Por ello, y con el fin de esclarecer el origen de estos progenitores hematopoyéticos, se procedió al estudio de los progenitores eritroides ó BFU-E, analizando la expresión de las

hemoglobinas y de los genes de las globinas en las colonias eritroides generadas por ellos.

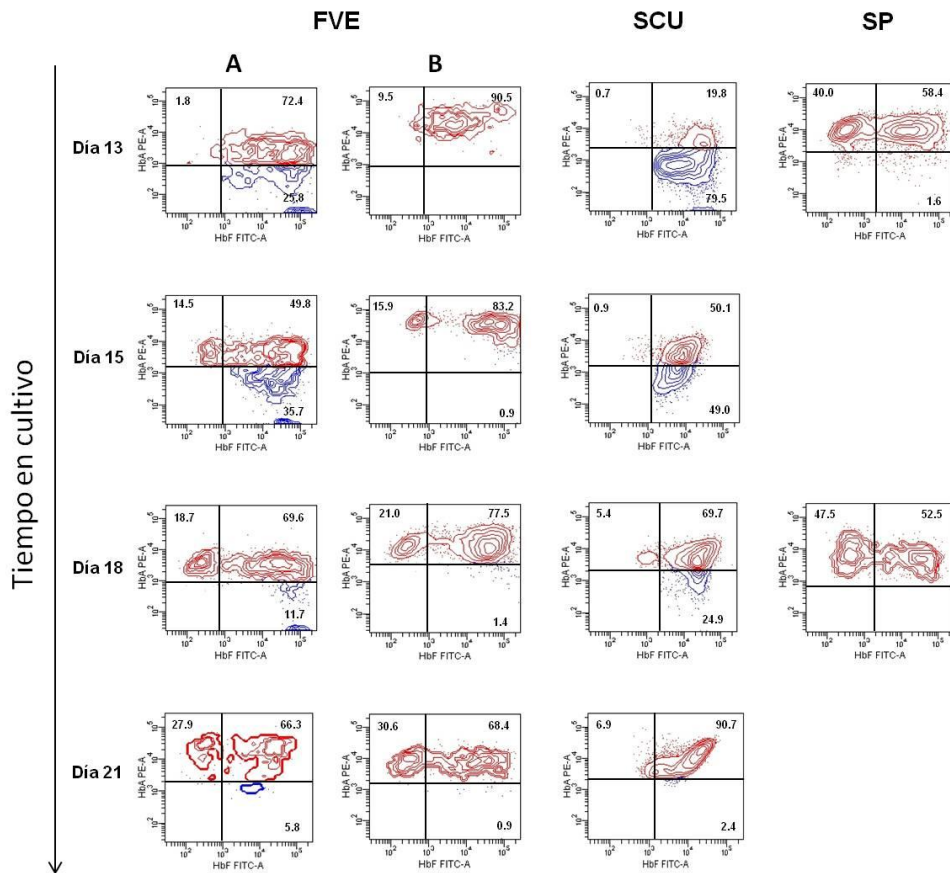
#### ***4.3. Análisis de la expresión de la hemoglobina***

El análisis de la expresión de las hemoglobinas se llevó a cabo mediante citometría de flujo. En la Figura 43 se muestra el protocolo de adquisición y análisis de las células eritroides. A los 12 o 13 días de cultivo, cuando las BFU-E estuvieron bien definidas, se pudo observar que la práctica totalidad de las células eritroides generadas por los progenitores de la FVE estaban agrupadas en torno a un amplio rango de niveles de intensidad de fluorescencia emitida por la HbF (Figura 44). Una elevada proporción de las células contenía ambas hemoglobinas HbF y HbA ( $\text{HbF}^+\text{HbA}^+$ ), detectándose muy pocas células que solo expresaran HbA ( $\text{HbF}^-\text{HbA}^+$ ). Como era de esperar, todas las células eritroides generadas por los progenitores  $\text{CD34}^+$  de SCU expresaron HbF, de las que aproximadamente un 20% también expresó HbA (Figura 44).

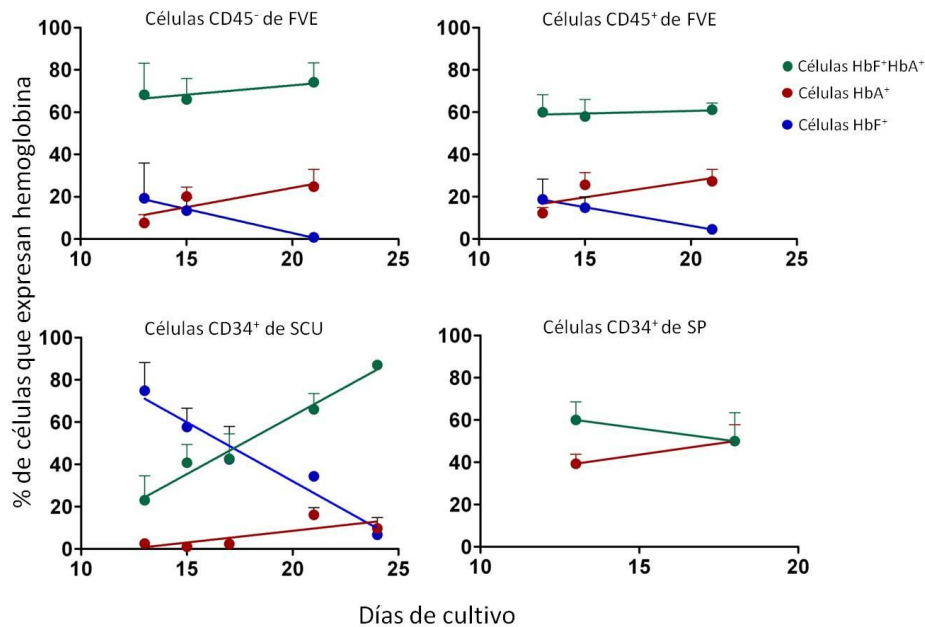


**Figura 43: Protocolo para la adquisición y el análisis de las células eritroides por citometría de flujo.** Las células eritroides se seleccionaron en base a criterios de FSC, SSC y de expresión antigénica. La expresión de la HbF conjugada con FITC y de la HbA (cadena  $\beta$ ) conjugada con PE se determinó en las células  $GFA^+CD45^-$  seleccionadas. El umbral de expresión estuvo determinado por los controles isotípicos.

Por el contrario, aproximadamente el 40% de las células eritroides generadas por las células  $CD34^+$  de SP solo expresó HbA, conteniendo el resto de la celularidad ambas hemoglobinas (Figura 44).



**Figura 44. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la hemoglobina en las células eritroides.** Se muestran los cambios en el nivel de expresión de la HbF y la HbA en las células eritroides generadas por las células de la FVE y por las células CD34<sup>+</sup> de SCU y SP a lo largo del tiempo en cultivo. Los diagramas de puntos corresponden a una muestra representativa. En el caso de las células derivadas de la FVE, se muestra la progresión de los cultivos procedentes de dos muestras representativas diferentes (A y B).



**Figura 45. Distribución de las células eritroides en función de la expresión de las distintas hemoglobinas a lo largo del tiempo en cultivo.** Los resultados se expresan como el porcentaje del total de las células que contienen hemoglobina. CD45<sup>-</sup> de la FVE, n = 5; CD45<sup>+</sup> de la FVE, n = 5; CD34<sup>+</sup> de SCU, n = 7 y CD34<sup>+</sup> de SP, n = 4. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar.

Para determinar los cambios en la expresión de las hemoglobinas a lo largo del tiempo se picaron las BFU-E a distintos días de cultivo. Tal como se observa en la Figura 45 y en la Tabla 3, las células eritroides generadas por los progenitores contenidos en las células CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> de la FVE mostraron una distribución en el perfil de expresión de la hemoglobina prácticamente idéntica. Además, este estudio permitió visualizar el cambio en la expresión de las hemoglobinas, fruto del proceso de maduración o diferenciación de las células eritroides. Así, la HbF fue parcialmente reemplazada por la HbA en las células eritroides generadas en todos los cultivos (Figura 45). Sin embargo, se pudo observar que todavía existía una

gran proporción de células  $\text{HbF}^+\text{HbA}^+$ , muy probablemente como resultado de haber sido generadas en un medio de cultivo que contenía suero [195, 196].

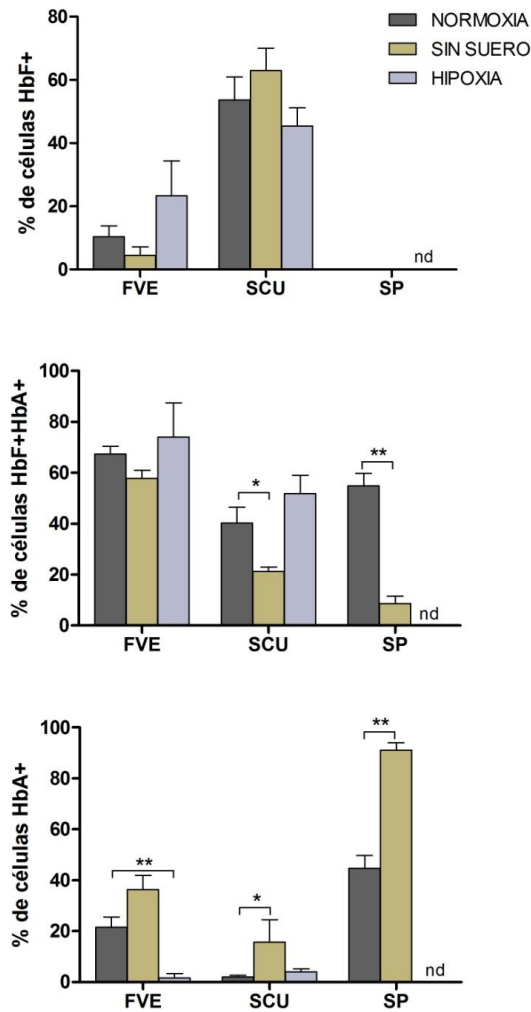
		13 días	15 días	21 días
HbF	$\text{CD45}^-$	19,3 ± 16,8	13,4 ± 5,9	0,8 ± 0,8
	$\text{CD45}^+$	18,7 ± 9,6	14,8 ± 5,2	4,6 ± 1,4*
HbA	$\text{CD45}^-$	7,6 ± 3,8	20,1 ± 4,4	24,8 ± 8,2**
	$\text{CD45}^+$	12,2 ± 2,6	25,6 ± 5,9	27,3 ± 5,6***
HbF + HbA	$\text{CD45}^-$	68,3 ± 15,0	66,0 ± 10,0	74,2 ± 9,2
	$\text{CD45}^+$	59,9 ± 8,4	58,0 ± 8,1	61,2 ± 3,2

**Tabla 3: Porcentaje de células eritroides expresando solo HbF, HbA o ambas, en las BFU-E generadas a partir de las células  $\text{CD45}^+$  y  $\text{CD45}^-$  de la FVE.** Los datos que se muestran en la tabla proceden de los presentados en la Figura 45.

De hecho, cuando las células  $\text{CD34}^+$  de SCU o de SP se cultivaron en un medio semisólido sin suero, el porcentaje de células  $\text{HbF}^-\text{HbA}^+$  aumentó de un modo significativo, y este cambio fue acompañado de un descenso significativo en la proporción de células  $\text{HbF}^+\text{HbA}^+$  (Figura 46). Además, y de acuerdo a lo publicado [197], en estas condiciones, el perfil de expresión de la hemoglobina en las células eritroides derivadas de progenitores hematopoyéticos de adulto fue casi idéntico al de los eritrocitos circulantes de donantes sanos (Figura 47).

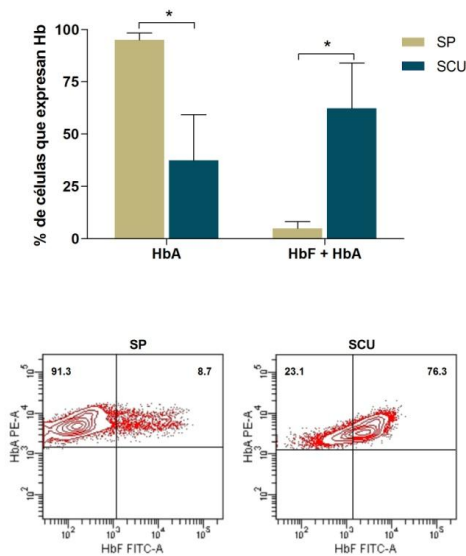
Por el contrario, la ausencia de suero en el medio de cultivo no indujo cambios en la expresión de las hemoglobinas en las células eritroides generadas a partir de las células de la FVE (Figura 46).

Se ha propuesto que las células de origen fetal o neonatal producen HbF, independientemente de las concentraciones de oxígeno, mientras que las de origen adulto producen más HbF en condiciones de hipoxia [198].



**Figura 46. Distribución de las células eritroides en función de las condiciones de cultivo.** Se llevaron a cabo cultivos en paralelo para examinar el efecto de la privación de suero (■) y de la hipoxia (5% O<sub>2</sub>) (□) sobre la expresión de la hemoglobina. Los cultivos tomados como control se realizaron en condiciones de normoxia (20% O<sub>2</sub>) y en presencia de suero (■). La expresión de la hemoglobina en las células eritroides se determinó por citometría de flujo a los 15 días de cultivo. Células de la FVE, n = 10; CD34<sup>+</sup> de SCU, n = 10 y CD34<sup>+</sup> de SP, n = 4. Los datos se expresan como la media ± error estándar. Diferencias significativas, \*p < 0.02, \*\*p < 0.0001.

## Resultados y Desarrollo Argumental



**Figura 47. Expresión de HbF y HbA en los eritrocitos de SCU y de SP.** El diagrama de barras muestra el porcentaje de eritrocitos que expresan solo HbA o HbF y HbA. SCU, n = 5; SP n = 5. \*p = 0,0016. Los diagramas de puntos muestran los análisis por citometría de flujo de una muestra representativa.

Para estudiar como una baja concentración de oxígeno afectaba a la síntesis de la hemoglobina, los cultivos se incubaron en una atmósfera de hipoxia (5% O<sub>2</sub>). Tal como se puede observar en la Figura 46, las células eritroides generadas por los progenitores CD34<sup>+</sup> de SCU exhibieron el mismo perfil en condiciones de normoxia que de hipoxia. Sin embargo, el porcentaje de las células HbF<sup>-</sup>HbA<sup>+</sup> disminuyó de un modo significativo en las colonias eritroides generadas por los progenitores de la FVE. Pero, en contra del bien establecido efecto que la hipoxia tiene sobre la reactivación de la HbF en los eritrocitos del adulto [198, 199], no se apreciaron cambios significativos en el porcentaje de las células HbF<sup>+</sup>HbA<sup>+</sup> ni en el de las células HbF<sup>+</sup>HbA<sup>-</sup> (Figura 46).



En este punto es importante recordar que el patrón de distribución de la hemoglobina en las células eritroides generadas por los progenitores hematopoyéticos contenidos en las células CD45<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup> de la FVE fue prácticamente indistinguible (Figura 45 y Tabla 3).

Con el fin de hacer una estimación aproximada del contenido de HbF en las células eritroides, se analizaron los valores de la intensidad media de fluorescencia emitida por la fluorescencia asociada a la HbF, un parámetro obtenido a partir de los análisis de citometría de flujo. Los resultados demostraron que la cantidad de HbF por célula HbF<sup>+</sup>HbA<sup>-</sup> fue significativamente más alta en las células eritroides generadas por las células CD45<sup>-</sup> que en las generadas por las células CD45<sup>+</sup>, y similar a la de las células HbF<sup>+</sup>HbA<sup>-</sup> neonatales (Tabla 4). Por lo tanto, estos resultados indican que los progenitores eritroides contenidos en la subpoblación celular CD45<sup>-</sup> de la FVE son más inmaduros que los contenidos en la subpoblación celular complementaria CD45<sup>+</sup>, y similares en ontogenia a los de la SCU.

	HbF		HbA	
	Células HbF <sup>+</sup> HbA <sup>-</sup>	Células HbF <sup>+</sup> HbA <sup>+</sup>	Células HbF <sup>-</sup> HbA <sup>+</sup>	Células HbF <sup>+</sup> HbA <sup>+</sup>
<b>CD45<sup>-</sup>FVE</b>	86778 ± 5585	53334 ± 3089	11505 ± 1305	13498 ± 1329
<b>CD45<sup>+</sup>FVE</b>	46362 ± 2176*	32637 ± 1527	12445 ± 487	11555 ± 461
<b>CD34<sup>+</sup>SCU</b>	75924 ± 9271	43885 ± 5407	9484 ± 1411	12428 ± 1377
<b>CD34<sup>+</sup>SP</b>		23495 ± 1768	12359 ± 627	10528 ± 298

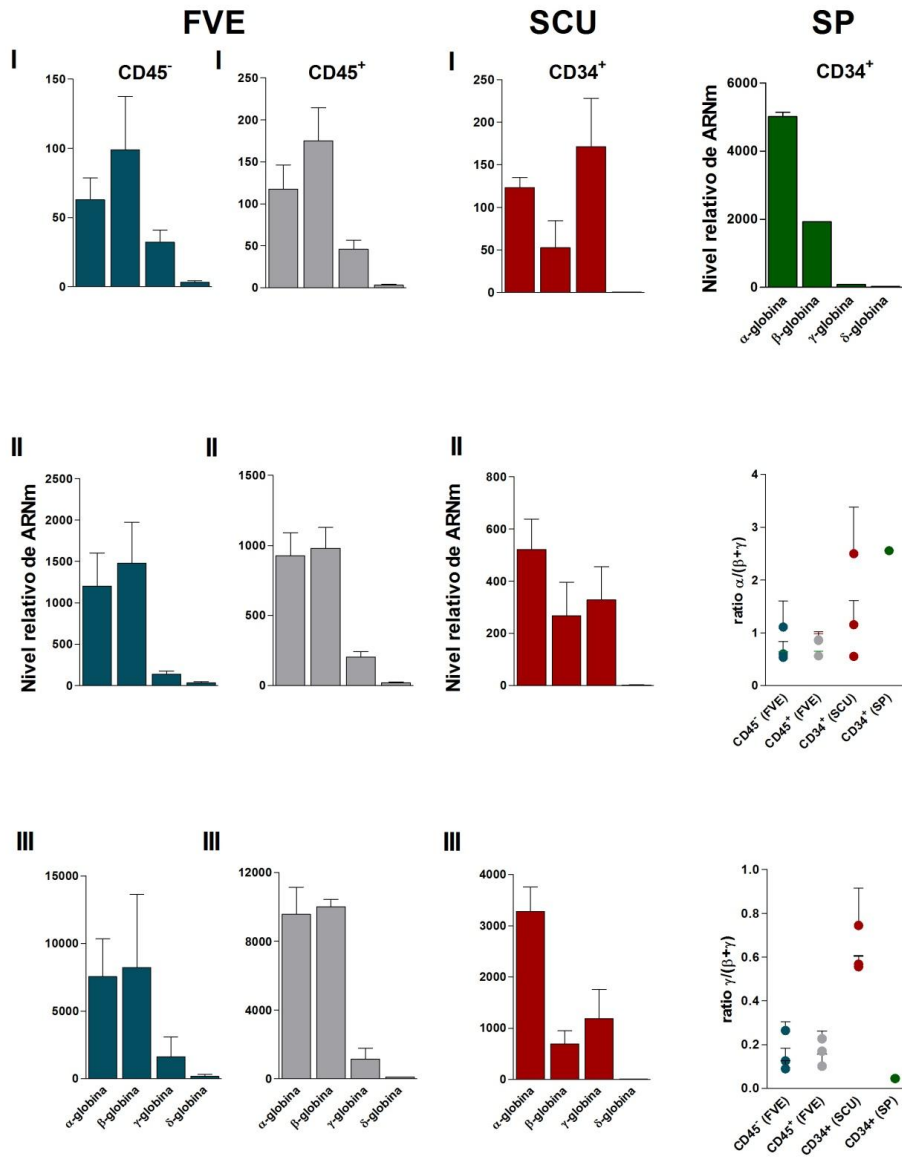
**Tabla 4. Valores de intensidad media de fluorescencia de las HbF y HbA en las células eritroides.** Datos correspondientes a las células eritroides generadas por los progenitores a los 15 días de cultivo (FVE y SCU) o a los 13 días de cultivo (SP), expresados como la media ± error estándar. Las muestras corresponden a las presentadas en la Figura 45. Diferencias significativas, células CD45<sup>+</sup> vs células

#### ***4.4. Análisis de la expresión de los genes de las globinas***

Los resultados de los análisis de expresión génica demostraron que el nivel de los transcritos para una misma globina en las células eritroides generadas por los progenitores de la SCU y de la FVE fueron muy variables, mientras que los datos obtenidos en las muestras procedentes de la SP fueron muy homogéneos. Como las BFU-E son el resultado de una expansión clonal, la variabilidad observada debe ser el resultado de la presencia de progenitores eritroides en diferentes estadios de maduración. Sobre la base de este concepto, y tomando como referencia el nivel de los transcritos de la globina  $\alpha$ , se agruparon los valores en tres grupos (en la Figura 48 aparecen como I, II y III).

Los resultados obtenidos pusieron en evidencia que en las células eritroides generadas por los progenitores  $CD34^+$  de SCU o de SP, los niveles de ARNm de la globina  $\alpha$  fueron siempre superiores a los de la globina  $\beta$ . Sin embargo, las células eritroides generadas por los progenitores contenidos en la FVE sintetizaron cantidades similares de ARNm de ambas globinas (Figura 48).

Como era de esperar, los mayores niveles de transcritos de la globina  $\gamma$  correspondieron a las células eritroides neonatales, mientras que los más bajos correspondieron a las de origen adulto. Sin embargo, las células eritroides derivadas de los progenitores de la FVE sintetizaron cantidades de ARNm de esta globina, de marcado carácter fetal, a unos niveles comprendidos entre los obtenidos por las células de la SCU y los de la SP (Figura 48).



**Figura 48. Expresión de los genes de las globinas en las células eritroides.** La células CD45<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> de la FVE, y los progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> de SCU y de SP se cultivaron en un medio semisólido y las células eritroides contenidas en las BFU-E generadas tras 15 días de cultivo se analizaron por RT-PCR. Los valores de los transcritos se normalizaron frente a *GAPDH*. Sobre la base de los valores de los transcritos de la globina  $\alpha$ , los valores de las globinas se agruparon en tres grupos (I, II y III). Se muestran los ratios  $\alpha/(\beta+\gamma)$  y  $\gamma/(\beta+\gamma)$  correspondientes a los diferentes grupos de muestras analizadas. Células CD45<sup>-</sup> de la FVE (■), n = 17; células CD45<sup>+</sup> de la FVE (■), n = 17; células CD34<sup>+</sup> de SCU (■), n = 10; células CD34<sup>+</sup> de SP (■) n = 4. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

Los valores de los ratios entre las distintas globinas no solo aportan información sobre la contribución de las diferentes globinas a la molécula de la hemoglobina, sino que también reflejan la ontogenia de la misma, y por lo tanto la de los progenitores eritroides.

Como se observa en la Figura 48, el valor del ratio  $\alpha/(\beta+\gamma)$  en las células eritroides generadas por los progenitores  $CD34^+$  de SP fue de 2,55, mientras que en las células eritroides neonatales contenidas en los grupos I, II y III los valores obtenidos para este ratio fueron 0,55, 1,15 y 2,50, respectivamente.

Por otra parte, los valores del ratio  $\gamma/(\beta+\gamma)$  en las células eritroides generadas por las células  $CD34^+$  de SCU contenidas en los grupos I, II y III fueron 0,74, 0,57 y 0,56, respectivamente, descendiendo hasta 0,04 para las generadas por los progenitores hematopoyéticos de adulto (Figura 48). Por lo tanto, los datos obtenidos corroboran el origen neonatal de los progenitores eritroides de la SCU, y además demuestran que los niveles de transcritos recogidos en el grupo I deben corresponder a los de las células eritroides más inmaduras.

Cuando se determinó el ratio  $\alpha/(\beta+\gamma)$  en las células eritroides generadas por los progenitores hematopoyéticos de la FVE, los valores obtenidos fueron desde 0,54 a 1,11 para las originadas por la subpoblación celular  $CD45^-$ , y desde 0,56 hasta 0,87 para las generadas por la subpoblación celular complementaria  $CD45^+$ . Por lo tanto, estos valores fueron muy similares a los obtenidos en las células eritroides de origen neonatal. Sin embargo, los valores del ratio  $\gamma/(\beta+\gamma)$  estuvieron comprendidos entre los alcanzados por las células neonatales y las de adulto (Figura 48).

Adicionalmente, y aunque la contribución de la globina  $\delta$  es de una importancia relativa en los individuos adultos sanos, pues la HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) solo supone un 1%-2% del total de la hemoglobina, nuestros resultados demuestran que los valores del ARNm de la globina  $\delta$  fueron superiores en las células de origen adulto que en las neonatales. Además, las muestras de la FVE agrupadas en el grupo I presentaron valores similares a los presentados por las células derivadas de la SCU, mientras que las de los grupos II y III fueron similares a los obtenidos en las células derivadas de los progenitores hematopoyéticos de la SP (Figura 48). Asimismo, y aunque sí se pudo detectar expresión de las globinas embrionarias  $\epsilon$  and  $\zeta$  en las muestras analizadas, los niveles obtenidos fueron muy bajos, como pudimos corroborar mediante electroforesis en geles de agarosa (datos no mostrados).

Por último, se determinó como afectaba a la expresión de los genes de las globinas la privación de suero y una atmósfera de hipoxia. Tal como se observa en la Tabla 5, cuando las células eritroides fueron generadas en un medio sin suero, el nivel de los transcritos de las globinas se redujo drásticamente en todas las muestras analizadas, aunque habría que señalar que en las células eritroides generadas por los progenitores hematopoyéticos de SCU y de SP la expresión de la globina  $\gamma$  fue la menos afectada. Estos resultados están en aparente contradicción con el aumento observado en el porcentaje de células HbA<sup>+</sup> en las células eritroides de origen hematopoyético y sugieren que los niveles de ARNm no solo están regulados a nivel post-transcripcional, sino que deben existir diferencias en la regulación de la transcripción entre las células eritroides generadas por los progenitores de la FVE y las generadas por los progenitores hematopoyéticos de la SCU y la SP.

		Globina $\alpha$	Globina $\beta$	Globina $\gamma$	Globina $\delta$
	CD45 <sup>+</sup> FVE	1,9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,6
SIN	CD45 <sup>-</sup> FVE	5,0 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,6
SUERO	CD34 <sup>+</sup> SCU	5,1 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,3	24,2 $\pm$ 1,2	17,5 $\pm$ 9,1
	CD34 <sup>+</sup> SP	3,5 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,8
	CD45 <sup>+</sup> FVE	90,6 $\pm$ 3,9	96,5 $\pm$ 7,7	140,3 $\pm$ 12,2	108,0 $\pm$ 5,7
HIPOXIA	CD45 <sup>-</sup> FVE	50,6 $\pm$ 3,0	72,5 $\pm$ 1,8	110,2 $\pm$ 1,9	125,5 $\pm$ 45,6
	CD34 <sup>+</sup> SCU	82,2 $\pm$ 3,2	56,7 $\pm$ 2,6	76,4 $\pm$ 4,7	94,0 $\pm$ 28,0

**Tabla 5. Efecto de la privación del suero y de una atmósfera hipóxica sobre la expresión de los genes de las globinas.** Las BFU-E obtenidas en medio semisólido sin suero en una atmósfera de O<sub>2</sub> al 20%, o en condiciones de hipoxia (5% O<sub>2</sub>) en un medio conteniendo suero se analizaron por RT-PCR. La expresión de los distintos genes se normalizó frente a *GAPDH*. Para obtener los incrementos de expresión, los valores de 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> correspondientes a las condiciones experimentales se dividieron por los valores de 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> obtenidos en las condiciones control. Los valores se dan en porcentaje. Las condiciones control consistieron en un medio conteniendo suero e incubación de los cultivos en normoxia. Los datos se dan como la media  $\pm$  error estándar. Normoxia en medio sin suero: células CD45<sup>+</sup> de la FVE, n = 4; células CD45<sup>-</sup> de la FVE, n = 4; células CD34<sup>+</sup> de SCU, n = 5; células CD34<sup>+</sup> de SP, n = 4. Hipoxia en medio conteniendo suero, células CD45<sup>+</sup> de la FVE, n = 4; células CD45<sup>-</sup> de la FVE, n = 6; células CD34<sup>+</sup> de SCU, n = 5. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

Por otra parte, cuando los progenitores hematopoyéticos de la SCU fueron inducidos a generar colonias eritroides en condiciones de hipoxia se pudo observar como una concentración de O<sub>2</sub> del 5% inducía un descenso moderado y similar en los niveles de ARNm de las globinas  $\alpha$  y  $\gamma$ , y un descenso más marcado en la expresión de la globina  $\beta$ .

Sin embargo, la hipoxia indujo un aumento en el nivel de transcritos de la globina  $\gamma$ , que fue moderado en las células eritroides generadas por los

progenitores hematopoyéticos contenidos en la subpoblación celular CD45<sup>-</sup> de la FVE y mucho más pronunciado en las generadas por las células CD45<sup>+</sup>. Adicionalmente, es interesante señalar cómo la hipoxia no alteró la expresión de las globinas  $\alpha$  y  $\beta$  en las células eritroides generadas por la subpoblación celular CD45<sup>+</sup> de la FVE, pero sí indujo una disminución en las generadas por la subpoblación celular CD45<sup>-</sup>. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en las células neonatales, el descenso más marcado se produjo en la expresión de la globina  $\alpha$ .

Teniendo en cuenta que el perfil de la hemoglobina depende de la ontogenia de los progenitores hematopoyéticos y que la respuesta a las condiciones de cultivo depende de ella [191-194], los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que no derivan de la médula ósea, sino del propio tejido adiposo.

Así, el cambio de la hemoglobina en respuesta a las condiciones de cultivo en las células eritroides generadas por los progenitores eritropoyéticos de la FVE difirió del presentado por las células derivadas de tejidos hematopoyéticos. En segundo lugar, en las células eritroides de origen neonatal o adulto, el nivel de ARNm de la globina  $\alpha$  siempre fue superior al de la globina  $\beta$ , lo que puede ser interpretado como una firma de su origen hematopoyético [200], mientras que en las células eritroides generadas por los progenitores eritroides de la FVE los niveles de los ARNm de las globinas  $\alpha$  y  $\beta$  fueron similares. Por último, dado que dos cadenas de globina  $\alpha$  se combinan con dos cadenas de globina  $\beta$  o dos de  $\gamma$  para formar la hemoglobina, deben existir diferencias tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional entre las células eritroides de los tejidos hematopoyéticos y las generadas por los progenitores de la FVE.





## OBJETIVO 5

### DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES DE LA FVE DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la microvasculatura preexistente. Este proceso se caracteriza por la sucesión de los siguientes eventos: vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, degradación de la matriz extracelular, proliferación y migración de las células endoteliales y finalmente maduración periendotelial [201]. Al tratarse de un proceso en el que intervienen elementos humorales y celulares [202], los ensayos *in vivo* aportan información en términos de formación de vasos, reclutamiento de células endoteliales y funcionalidad de los vasos a través de la anastomosis con la vasculatura del huésped.

El Matrigel™ se ha convertido en una herramienta de enorme valor para estudiar la angiogénesis, debido a su similitud con la matriz extracelular natural. El uso de implantes de Matrigel está considerado uno de los ensayos más rápidos para el cribado de inhibidores y estimuladores de la angiogénesis [203, 204]. La respuesta angiogénica en el implante depende tanto de las características del animal como de la zona donde se inyecte el implante. Así, los ratones jóvenes (hasta 6 meses de edad) crean menos vasos que los ratones más viejos, mientras que los implantes en la zona dorsal generan una menor respuesta angiogénica, que los implantes en la zona ventral [203, 204]. Dado que el Matrigel cuando se inyecta es avascular, cualquier vaso que se forme es fácilmente distinguible.

Posiblemente los dos factores más ampliamente utilizados para inducir una angiogénesis en implantes de matrigel sean el VEGF y el bFGF [205, 206]. Se ha sugerido que el bFGF induce la vascularización al activar el sistema VEGF/VEGFR [207]. Además, promueve la dispersión de las células endoteliales y la formación de las interacciones célula-célula requeridas para la maduración de los vasos [128, 207, 208]. Muchos factores con potencial angiogénico, como el VEGF, el bFGF, el factor de crecimiento placentario (PIGF, *placental derived growth factor*), el EGF o la angiogenina, se unen a la heparina. Además, se ha demostrado que la heparina es necesaria para las interacciones entre el factor y su receptor, funcionando como un activador del proceso angiogénico a bajas concentraciones.

Para evaluar la capacidad de las células de la FVE de inducir una neoangiogénesis se han usado ratones atómicos inmunodeficientes como huéspedes de los implantes de Matrigel. La ventaja del uso de estos animales es que se evita la angiogénesis en los implantes acelulares de Matrigel, al estar inhibida la respuesta inflamatoria [205, 209]. Así, la activación y propagación de la respuesta angiogénica está limitada a la efectividad del estímulo angiogénico contenido en el Matrigel, en este caso las células aisladas o derivadas de la FVE. Asimismo, se ha usado Matrigel-GFR (reducido en factores de crecimiento) para evitar la influencia de los mismos en la activación de la angiogénesis.

El implante subcutáneo de Matrigel con MSC generadas a partir de médula ósea [210] y de progenitores endoteliales derivados de SCU [211] ha demostrado la capacidad de estas células de inducir una angiogénesis, y por ello se ha sugerido como modelo para el desarrollo de nuevas aproximaciones dirigidas a mejorar la neovascularización en protocolos de ingeniería de tejidos.

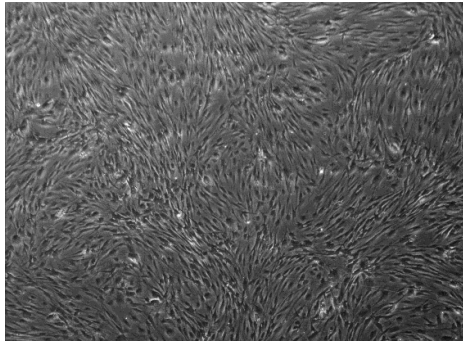
Está ampliamente descrito en la literatura que las MSC derivadas de la médula ósea, de tejido adiposo u otras fuentes, al secretar factores angiogénicos, inducen una neoangiogénesis en la zona del inóculo (84, 104, 110).

La FVE del tejido adiposo humano, a diferencia de la médula ósea, contiene en la subpoblación celular CD45<sup>-</sup>, células CD31<sup>+</sup> capaces de inducir la angiogénesis en un modelo animal de isquemia de miembros inferiores (101-104, 110). Sin embargo, son pocos los estudios que comparan la capacidad angiogénica de la subpoblación celular CD45<sup>-</sup> aislada y no sometida a ningún tipo de manipulación, frente a la de las MSC obtenidas en cultivo.

Por otra parte, se ha demostrado en este trabajo que las células hematopoyéticas contenidas en la FVE, y en especial la subpoblación de monocitos presenta un perfil antigénico muy angiogénico. Por ello, es posible que estas células faciliten la angiogénesis fisiológica en el tejido adiposo.

### ***5.1 Análisis de las MSC***

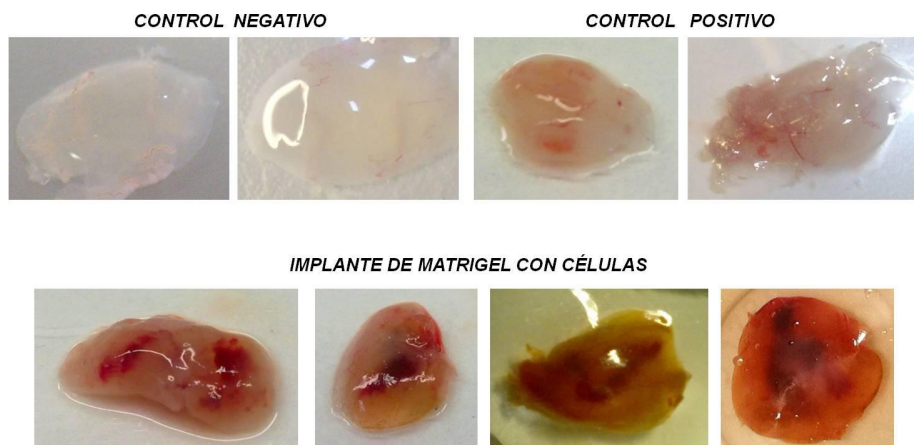
Las MSC obtenidas a partir de las células CD45<sup>-</sup> de la FVE, aisladas mediante métodos inmunomagnéticos, presentaron una apariencia muy uniforme, y una morfología similar a la de los fibroblastos (Figura 49). El análisis de citometría de flujo demostró que fueron negativas para los antígenos CD45, CD34, CD31 y positivas para CD90 y CD105 (datos no mostrados).



**Figura 49. Aspecto morfológico de las MSC derivadas de la subpoblación celular CD45<sup>-</sup> de la FVE.** Las células CD45<sup>-</sup> se cultivaron en medio EGM-2MV. Imagen de microscopía de contraste de fases a los 10 días de cultivo. Amplificación 10x.

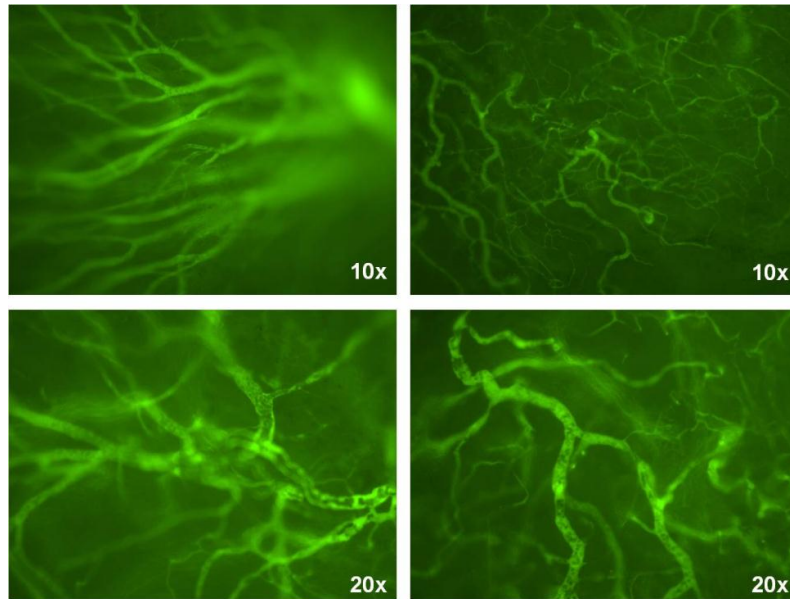
### **5.2 Las Células de la FVE estimulan la angiogénesis**

A las dos semanas post-implante, se pudieron apreciar macroscópicamente vasos sanguíneos en los implantes de Matrigel conteniendo las células de la FVE, mientras que los controles negativos (Matrigel solo) fueron avasculares, y en los controles positivos (Matrigel suplementado con bFGF y heparina) se pudo observar un ligero tono rosáceo con algún vaso sanguíneo en su interior (Figura 50).



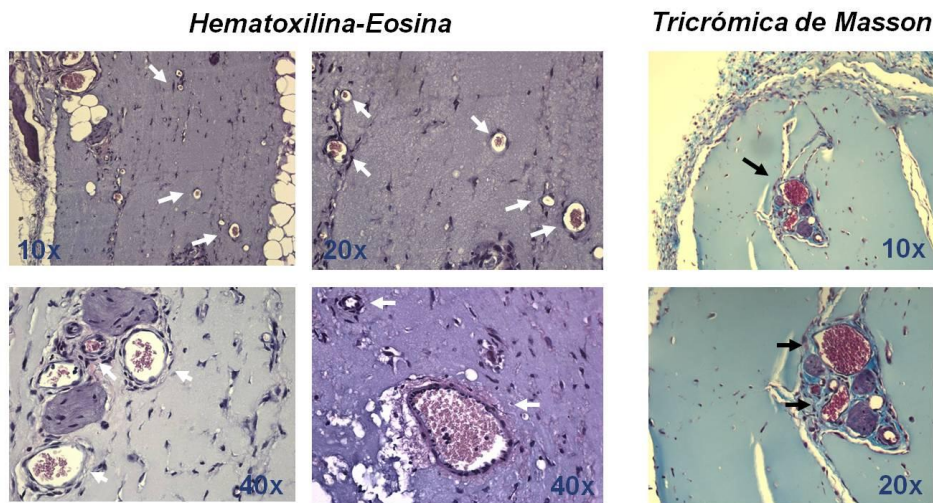
**Figura 50: Angiogénesis inducida por células de la FVE del tejido adiposo humano.** Aspecto macroscópico de diferentes implantes de Matrigel a los 14 días, conteniendo ó no células de la FVE.

Con el fin de marcar la vasculatura del animal, se inyectó dextrano-FITC en la vena de la cola. Tal como se observa en la Figura 51 las células de la FVE indujeron la formación de estructuras fluorescentes, bien definidas, llenas de eritrocitos.



**Figura 51: Visualización del dextrano conjugado con FITC en los implantes celulares de Matrigel.** La distribución vascular del dextrano-FITC se visualizó por microscopía de fluorescencia. Se muestra el aspecto de los vasos formados en cuatro implantes diferentes.

Las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina o con la tricrómica de Masson se usaron para definir el Matrigel, la interfase Matrigel-tejido y las estructuras vasculares. Los nuevos vasos formados se definieron como estructuras lumbales conteniendo células sanguíneas perfectamente identificables. Tal como se observa en la Figura 52, en muchos de los vasos sanguíneos formados se pudieron apreciar las células endoteliales alineadas delimitando la luz del vaso.

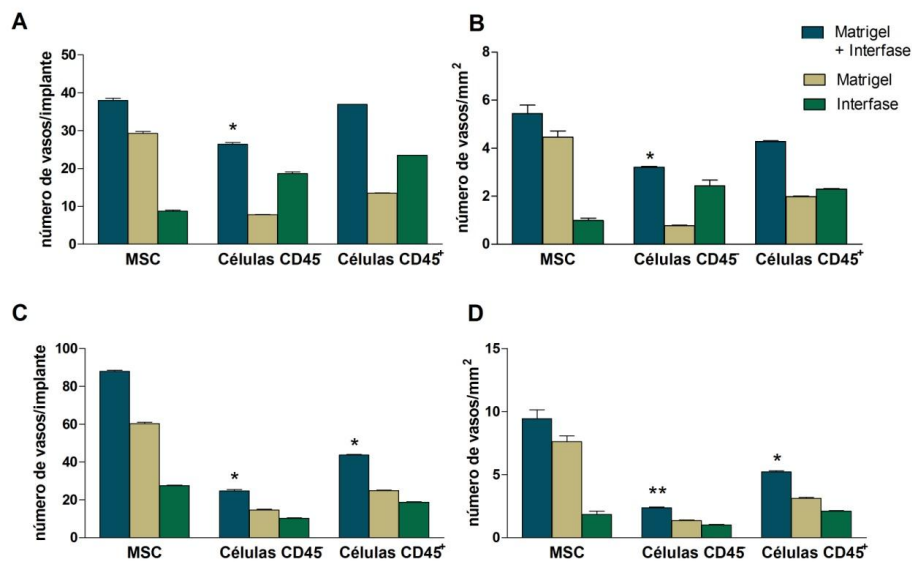


**Figura 52: Tinciones histológicas de los implantes de Matrigel.** Los cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina o con la tricrómica de Masson. Las imágenes muestran vasos sanguíneos, indicados con flechas, de distinto calibre, conteniendo eritrocitos.

Existen varios métodos para determinar la angiogénesis inducida en el Matrigel: cuantificación de la hemoglobina contenida en el implante [212, 213], medida del volumen de plasma en el implante [214], enumeración de las células endoteliales por citometría de flujo [215], cuantificación de la fluorescencia emitida por el dextrano-FITC, previamente inyectado por vía intravenosa al animal [216], y conteo de los vasos en las preparaciones inmunohistoquímicas, siendo este último el método utilizado en este trabajo.

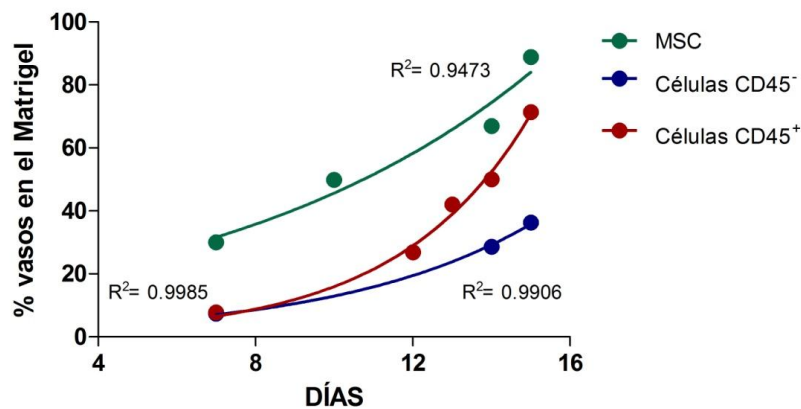
Tras efectuar el recuento de los vasos sanguíneos en las preparaciones, se estimó la zona más vascularizada del implante para determinar la densidad de los vasos. Los resultados obtenidos demuestran que las MSC indujeron la formación de  $38 \pm 3$  vasos/implante, una densidad vascular prácticamente idéntica a la inducida por las células  $\text{CD45}^+$  ( $37 \pm 1$  vasos/implante), y ligeramente superior, aunque estadísticamente significativa, a la inducida por las

células CD45<sup>-</sup>, que fue de  $26 \pm 2$  vasos/implante. Sin embargo, tal como se observa en la Figura 53A mientras que en los implantes conteniendo MSC más del 75% de los vasos formados estaban en el interior del Matrigel, en los implantes con células CD45<sup>+</sup> o con células CD45<sup>-</sup>, solo el 37% o el 29% de los vasos sanguíneos recién formados, respectivamente, había alcanzado el interior del Matrigel, lo que indica que la mayoría de los vasos sanguíneos inducidos por las células aisladas de la FVE se encontraba en la interfase Matrigel-tejido. Resultados similares se obtuvieron cuando las densidades vasculares se expresaron por mm<sup>2</sup> de implante (Figura 53B).



**Figura 53. Efecto del bFGF sobre la angiogénesis inducida por las células derivadas, o aisladas de la FVE.** La densidad vascular en los implantes de Matrigel conteniendo células de la FVE (A, B) o células más bFGF y heparina (C, D), a los 14 días post-implante, expresada en número de vasos por implante, o en número de vasos por mm<sup>2</sup> de implante. Se muestra la distribución de los vasos en el interior del Matrigel y en la interfase Matrigel-tejido. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar (n = 4/tipo celular). (A, B) Células CD45<sup>-</sup> vs CD45<sup>+</sup> y vs MSC: \*p=0,001. (C) Células CD45<sup>-</sup> vs CD45<sup>+</sup> y vs MSC \*p<0,0001; Células CD45<sup>+</sup> vs MSC: \*p<0,0001. (D) Células CD45<sup>-</sup> vs CD45<sup>+</sup> y vs MSC: \*\*\*p<0,0001; Células CD45<sup>+</sup> vs MSC: \*p=0,02.

Para determinar la cinética de crecimiento de los vasos, se extirparon los implantes de Matrigel a distintos tiempos. A los 7 días post-implante, la práctica totalidad de los vasos inducidos por las células aisladas CD45<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup> de la FVE se encontraba en la periferia del Matrigel, mientras que aproximadamente un 30% de los vasos inducidos por las MSC había penetrado en interior del mismo (Figura 54). Entre los 7 y los 14 días hubo un crecimiento exponencial. Sin embargo, mientras la angiogénesis inducida por las MSC y las células CD45<sup>+</sup> presentó una cinética similar, la respuesta fue mucho más lenta en los implantes que contenían las células CD45<sup>-</sup> (Figura 54).



**Figura 54. Distribución de los vasos formados en los implantes de Matrigel a lo largo del tiempo.** A los tiempos indicados se extrajeron los implantes, se incluyeron en parafina y se procesaron. Los vasos se contaron en las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar y corresponden a 2 implantes por cada tipo celular

Es un hecho conocido que la angiogénesis inducida por las MSC está mediada principalmente por un efecto paracrino. Por tanto, es posible que las diferencias observadas en la respuesta angiogénica sean debidas a diferencias en la cantidad de factores angiogénicos secretados por las distintas células.



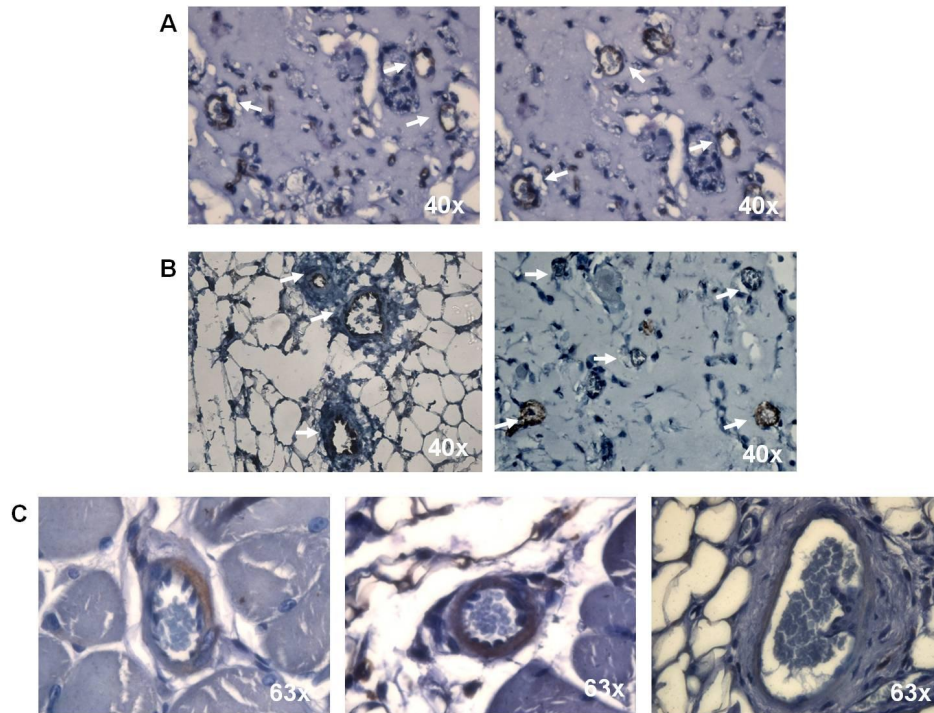
De hecho, cuando los implantes de Matrigel conteniendo MSC fueron suplementados con bFGF y heparina, la densidad vascular aumentó aproximadamente dos veces (Figura 53C, 53D). Sin embargo, la adición de estos compuestos a los implantes de células CD45<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup> no indujo, en términos de densidad vascular, un aumento de la angiogénesis (Figura 53C, 53D). Este hecho resulta sorprendente, ya que la sola adición de los mismos al Matrigel desprovisto de células, indujo la formación de  $10 \pm 3$  vasos en los implantes.

Se ha descrito que el bFGF promueve una respuesta angiogénica estromal al activar la expresión del VEGF en las células del estroma [217]. Aunque no se observó reclutamiento de células estromales en la interfase Matrigel-tejido, probablemente porque se trata de un fenómeno temprano y los implantes se extirparon a los 14 días, es probable que este efecto contribuyera al aumento de la angiogénesis observado en los implantes con MSC.

Un estudio más detallado de la densidad vascular en los implantes demostró que en presencia del bFGF, el porcentaje de los vasos sanguíneos que había en el interior del Matrigel aumentó de manera significativa en los implantes con células CD45<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup> respecto de los implantes sin suplementos, mientras que no se observaron cambios en la distribución de los vasos sanguíneos en los implantes con MSC (Figura 53C, 53D). Estos resultados demuestran que en presencia de las células aisladas CD45<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, el bFGF tuvo un papel esencial en la elongación o crecimiento de los vasos sanguíneos, probablemente al facilitar la dispersión de las células endoteliales a través de la matriz extracelular [208, 209, 128, 218].

### 5.3 Las células CD45<sup>+</sup> de la FVE se incorporan en los vasos sanguíneos formados

El reclutamiento de las células endoteliales para la formación de la red angiogénica en los implantes de Matrigel se evaluó también mediante tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CD31. Tal como se observa en la Figura 55A, las estructuras vasculares fueron positivas para el CD31 de origen murino, lo que demuestra que los vasos formados y reclutados en el Matrigel tenían su origen en el huésped.



**Figura 55. Caracterización inmunohistoquímica de los implantes de Matrigel a los 14 días post-implante.** Los implantes conteniendo las células CD45<sup>+</sup> de la FVE se tiñeron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD31 (A), y los anticuerpos policlonales humanos e-NOS (B) y CD45 (C).

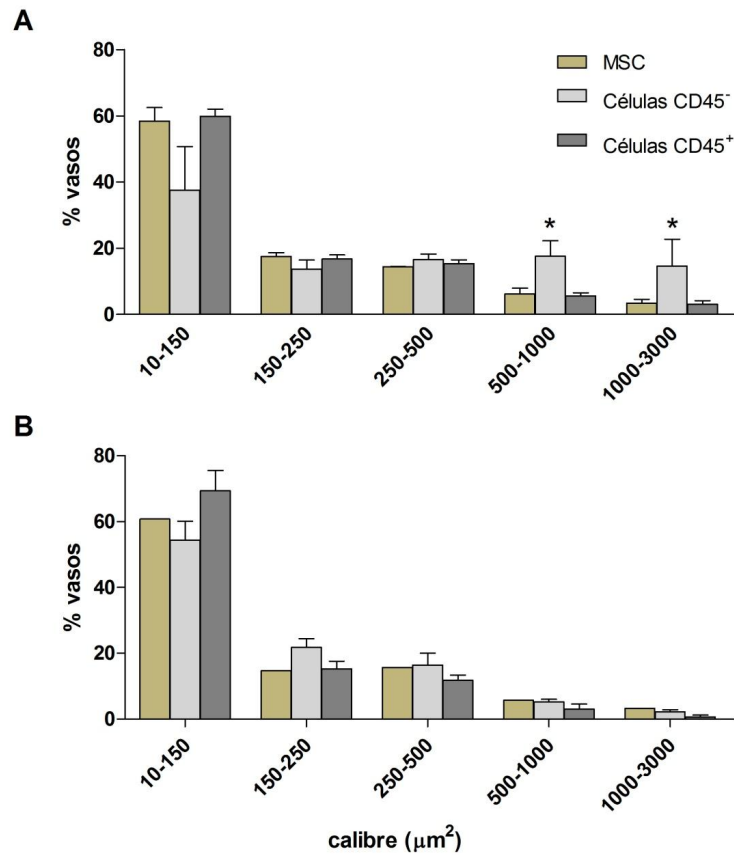
El examen microscópico de los implantes de Matrigel embebidos con células CD45<sup>+</sup> revelaron que estas células se asociaron a las estructuras vasculares, situándose en la capa íntima endotelial de los vasos (Figura 55B). Además,

la tinción con el anticuerpo monoclonal para la eNOS demostró una alta expresión de eNOS de origen humano en la zona luminal endotelial (Figura 55C). Si las células CD45<sup>+</sup> de la FVE en contacto con las estructuras vasculares experimentan una inducción de la expresión de la eNOS, queda por resolver. Lo cierto es que no se observó positividad para eNOS en los implantes conteniendo MSC o células CD45<sup>-</sup>. Estos resultados sugieren que las células CD45<sup>+</sup> de la FVE del tejido adiposo humano, incorporándose en la vasculatura deben tener un papel esencial en la estabilización de los nuevos vasos, y posiblemente tengan un papel relevante en la angiogénesis fisiológica del tejido adiposo.

#### **5.4 Las células de la FVE estimulan la arteriogénesis**

Las tinciones de hematoxilina-eosina y la tricrómica de Masson (Figura 52) revelaron el desarrollo de vasos sanguíneos de gran tamaño (diámetro superior a 20  $\mu\text{m}$ ), mientras que la inmunohistoquímica permitió observar la presencia de arteriolas, definidas como vasos sanguíneos conteniendo células musculares en su pared (Figura 55).

El cálculo del calibre de los vasos formados (*software LEICA Application Suite, versión 4.0*) permitió demostrar que aproximadamente el 15% y el 8% de los vasos formados en los implantes de Matrigel conteniendo MSC tenía una área comprendida entre 250  $\mu\text{m}^2$  y 500  $\mu\text{m}^2$ , o superior a 500  $\mu\text{m}^2$ , respectivamente (Figura 57A). La densidad de los vasos de diámetro superior a 20  $\mu\text{m}$  en los implantes con células CD45<sup>+</sup> fue prácticamente idéntico al observado en los implantes con MSC. Sin embargo, las células CD45<sup>-</sup> indujeron una mayor proporción de vasos de calibre superior a 500  $\mu\text{m}^2$  (Figura 56A).



**Figura 56. Áreas de los vasos a los 14 días post-implante.** Distribución de los vasos formados, en función del calibre, en los implantes de Matrigel conteniendo solo células (A), o células más bFGF y heparina (B). Los valores corresponden a la media del número de vasos comprendidos en un rango de áreas determinado. Los valores se expresan como la media  $\pm$  error estándar y corresponden a 4 implantes por tipo celular. (A) Células CD45<sup>-</sup> vs células CD45<sup>+</sup> y vs MSC: \* p<0,05.

La adición del bFGF en los implantes celulares de Matrigel no afectó de manera significativa ni al calibre de los vasos ni a la distribución de los mismos (Figura 56B).

## ***CONCLUSIONES***



## CONCLUSIONES

1. Los precursores mesodérmicos de la FVE del tejido adiposo humano con capacidad de formar CFU hematopoyéticas están contenidos en la subpoblación celular  $CD45^-Fib^-CD34^+$ , y son no adherentes.
2. La frecuencia de los progenitores hematopoyéticos en la subpoblación celular  $CD45^+$  de la FVE fue 4 veces superior a la de la su complementaria  $CD45^-$ , aunque no hubo diferencias en la distribución de las CFU.
3. El cultivo en medio líquido de las células de la FVE con las citocinas SCF, FL, TPO e IL-6 indujo una expansión de las CFU, que fue significativamente mayor en la subpoblación celular  $CD45^-$  cuando los cultivos se realizaron a una concentración de oxígeno del 5%.
4. Las células de la FVE, al igual que los progenitores hematopoyéticos de SCU y SP de adulto expresaron los genes *SCL/TAL1*, *GATA2*, *RUNX1* y *RUNX2*, pero no así *GATA1*, que se indujo tras la incubación de las células en un medio óptimo para la expansión de progenitores hematopoyéticos.
5. La práctica totalidad de las células eritroides generadas por los BFU-E de la FVE expresó HbF, sola o combinada con HbA. Mientras que la privación de suero no indujo cambios en la distribución celular de las hemoglobinas, la hipoxia indujo una disminución significativa en el porcentaje de células que solo expresaban HbA.

## Conclusiones

6. El nivel de expresión del gen de la globina  $\alpha$  fue superior al de la globina  $\beta$  en las células eritroides generadas por los progenitores  $CD34^+$  de SCU y SP, pero similar en las generadas por los progenitores eritroides de la FVE.
7. El gen de la globina  $\gamma$  en las células eritroides derivadas de los progenitores de la FVE se expresó a niveles intermedios entre los expresados por las células eritroides neonatales y las de adulto.
8. Los valores del ratio de las globinas  $\alpha/(\beta+\gamma)$  en las células eritroides derivadas de los progenitores de la FVE fueron similares a los de las células eritroides neonatales, mientras que los del ratio  $\gamma/(\beta+\gamma)$  estuvieron comprendidos entre los alcanzados por las células neonatales y las de adulto.
9. La subpoblación celular  $CD45^+$  de la FVE contiene células  $CD14^+$  que expresan además del  $CD31$  y el  $Flt-1$ ,  $CD34$ ,  $Tie-2$  y  $KDR$ . Posiblemente, este perfil antigénico pro-angiogénico contribuya a la angiogénesis en el tejido adiposo.
10. En un modelo de implante celular subcutáneo, la angiogénesis inducida por las células  $CD45^+$  fue superior a la de las células  $CD45^-$  y similar a la inducida por las MSC. Además, las células  $CD45^+$  se incorporaron en los vasos formados.

## Conclusión general

Aunque no se ha podido identificar una población discreta de células  $CD34^+$  con un fenotipo de progenitor hematopoyético, los resultados obtenidos en



esta tesis demuestran que la FVE del tejido adiposo humano contiene progenitores hematopoyéticos. Además, el estudio de los progenitores eritroides sugiere fuertemente que son diferentes a los circulantes en sangre, y por lo tanto no deben tener su origen en la médula ósea sino en el propio tejido adiposo.



## ***BIBLIOGRAFÍA***



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kaiser LR. The future of multihospital systems. *Top Health Care Financ.* 1992 Summer;18(4):32-45.
2. Greenwood HL, Singer PA, Downey GP et al. Regenerative medicine and the developing world. *PLoS Med* 2006;3(9):e381.
3. Daar AS and Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1(3):179-84.
4. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC et al. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-496
5. Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH et al. Whole Body Irradiation Ad Isologous Marrow Transplantation In Man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-1716.
6. Donnal Thomas E. Bone Marrow Transplantation: A Historical Review. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2000; 33:209-218. Simpósio: TRANSPLANTE DE MEDULA OSSEA.
7. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007;357:1472-1475.
8. Bach FH, Albertini RJ, Joo P et al. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968;2:1364-1366.
9. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD et al. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;2:1366-1369.
10. de Koning J, van Bekkum DW, Dicke KA et al. Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969;1:1223-1227.
11. Verfaillie CM, Pera MF and Lansdorp PM. Stem Cells: Hype and Reality. *Hematology* 2002;2002:369-391.

#### Bibliografia

12. Evans MJ and Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature** 1981;292:154–156.
13. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1981;78:7634–7638.
14. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature** 1997;385:810–813.
15. Thomson JA, Itskovitz–Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science** 1998;282:1145–1147.
16. Shambloott M, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998;95:13726–13731.
17. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony–forming cells among spleen colonies. **J Cell Comp Physiol.** 1963; 62:327–336.
18. Becker A, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. **Nature** 1963;197:452–454.
19. Baum C, Weissman I, Tsukamoto A et al. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1992;89:2804.
20. Ogawa M, Hanada K, Hamada H et al. Long–term lymphohematopoietic reconstitution by a single 34–low/negative hematopoietic stem cell. **Science** 1996;273:242–245.
21. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side–population phenotype. **Nat Med** 2001;7:1028–1034.
22. Goodell M, Brose K, Paradis G et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. **J Exp Med** 1996;183:1797–1806.

23. Goodell M, Rosenzweig M, Kim H, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of 34 antigen exist in multiple species. **Nat Med** 1997;3:1337-1345.
24. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. **Nat Med** 1996;2:1329-1337.
25. Michallet M, Philip T, Philip I, et al. Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. **Exp Hematol** 2000;28:858-870.
26. Kawashima I, Zanjani E, Almada-Porada G et al. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. **Blood** 1996;87:413-414.
27. Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC et al. Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34+ side population (SP) phenotype. **J Clin Invest** 2001;108:1071-1077.
28. Majeti R, Park CY and Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. **Cell Stem Cell** 2007;1:635-645.
29. Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. **Blood** 1999;94:2548.
30. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. **Nat Med** 1998;4:1038.
31. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG et al. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. **Exp Hematol** 1998;26:353.
32. Ciraci E, Della Bella S, Salvucci O et al. Adult human circulating CD34<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup> cells can differentiate into hematopoietic and endothelial cells. **Blood** 2011;118:2105-2115.

#### Bibliografía

33. Dennis JE, and Caplan AI. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Stem cells Handbook**. Capítulo 10. pp: 107–117. Ed. Sell Stewart. 2004.
34. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res** 1991;9:641–650.
35. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell** 2008;2(4):313–319.
36. Pittenger M, Mackay A, Beck S, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science** 1999;284:143–147.
37. Ho AD and Punzel M. Hematopoietic stem cells: can old cells learn new tricks?. **J Leukoc Biol** 2003;73:547–555.
38. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999;96:14482–14486.
39. Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **J Clin Invest** 2001;107:1395–1401.
40. Kawada H, Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. **Blood** 2001;98:2008–2013.
41. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997;94:4080–4085.
42. Mezey E, Chandross KJ, Harta G et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science** 2000;290:1779–1782.
43. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science** 1999;284:1168–1170.
44. Jones OY, Gok F, Rushing EJ et al. Engraftment of donor mesenchymal stem cells in chimeric BXSB includes vascular endothelial cells and hepatocytes. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**. 2011;4: 73–78.



45. Dennis JE, and Charbord P. Origin and Differentiation of Human and Murine Stroma. **Stem Cells** 2002;20:205–214.
46. Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. **Development** 2009;136:1951–1960.
47. Conigliaro A, Brenner DA and Kisseleva T. Hepatic progenitors for liver disease: current position. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications** 2010;3:39–47.
48. Masson NM, Currie IS, Terrace JD, et al. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2006;291:G45–G54.
49. Suzuki A, Zheng YY, Kaneko S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. **J Cell Biol.** 2002;156:173–184.
50. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. **Cell** 2003;114:763–776.
51. Jiang Y, Jahagirdar B, Reyes M et al. Pluripotent nature of adult marrow derived mesenchymal stem cells. **Nature** 2002;418:41–49.
52. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995;92:4857–4861.
53. Nilsson SK, Dooner MS, Weier HU, et al. Cells capable of bone production engraft from whole bone marrow transplants in nonablated mice. **J Exp Med** 1999;189:729–734.
54. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nat Med** 1999;5:309–313.
55. Caplan AI. Review: Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics. **Tissue Eng** 2005;11(7–8):1198–1211.

## Bibliografia

56. Koc, ON, Gerson SL, Cooper BW et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous–blood stem cells and culture–expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high–dose chemotherapy. **J Clin Oncol** 2000;18:307–316.
57. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non–human primates following systemic infusion. **Exp Hematol** 2001;29:244–255.
58. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood–derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. **Exp Hematol** 2002;30:870–878.
59. Di Nicola M, Carlo–Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T–lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood** 2002;99:3838–3843.
60. Krampera M, Cosmi L, Angeli R et al. Role for interferon–[gamma] in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells** 2006;24:386–398.
61. Djouad F, Ponce P, Bony C et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood** 2003;102:3837–3844.
62. Ringden O, Labopin M, Bacigalupo A et al. Transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA–identical siblings in adult patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol** 2002;20:4655–4664.
63. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B et al. Treatment of severe acute graft–versus–host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet** 2004;363:1439–1441.
64. Djouad F, Bouffi C, Ghannam S et al. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol** 2009;5:392–399.
65. Jorgensen C. Mesenchymal stem cells immunosuppressive properties: is it specific to bone marrow–derived cells? **Stem Cell Research & Therapy** 2010;1:15.

66. Robich MP, Chu LM, Oyamada S et al. Myocardial therapeutic angiogenesis: A review of the state of development and future obstacles. **Expert Rev Cardiovasc Ther** 2011;9:1469–1479.
67. Wollert KC, Drexler H. Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: A critical appraisal. **Nat Rev Cardiol** 2010;7:204–221.
68. Szöke K, and Brinchmann J E. Concise Review: Therapeutic Potential of Adipose Tissue-Derived Angiogenic Cells. **Stem Cells Translational Medicine** 2012;1:658–667.
69. Patel AN, Genovese J. Potential clinical applications of adult human mesenchymal stem cell (Prochymal®) therapy. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications** 2011;4:61–72.
70. Williams JT, Southerland SS, Souza J et al. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **American Surgeon** 1999;65:22–26.
71. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering** 2001; 7:211–228.
72. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol** 2000; 109: 235–242.
73. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000;97:13625–13630.
74. De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis and Rheumatism** 2001;44:1928–1942.
75. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S et al. Circulating skeletal stem cells. **J Cell Biol** 2001;153:1133–1140.
76. In ’t Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood** 2003;102:1548–1549.

Bibliografía

77. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. **Circ Res** 2007;100:1249-1260.
78. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase c (clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. **J Biol Chem** 1966;241:130-139.
79. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. **J Biol Chem** 1966;241:3909-3917.
80. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Mol Biol Cell** 2002;13:4279-4295.
81. Strem BM, KC Hicok, M Zhu et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med** 2005;54:132-141.
82. Martin RJ, Hausman GJ, Hausman DB. Regulation of adipose cell development in utero. **Proc Soc Exp Biol Med** 1998;219:200-210.
83. Wright JT, Hausman GJ. Adipose tissue development in the fetal pig examined using monoclonal antibodies. **J Anim Sci** 1990;68:1170-1175.
84. Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **J Clin Invest** 2007;117:2362-2368.
85. Boquest AC, Shahdadfar A, Fronsdal K et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: Alteration of gene expression after in vitro cell culture. **Mol Biol Cell** 2005;16:1131-1141.
86. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S et al. The immunophenotype of human adipose derived cells: temporal changes in stromal- and stem cell-associated markers. **Stem Cells** 2006;24:376-385.
87. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The InteARNtional Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy** 2006;8:315-317.
88. Maurer MH. Proteomic Definitions of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International** 2011; Article ID 704256.

89. Izadpanah R, Trygg C, Patel B et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **J Cell Biochem** 2006;99:1286 –1297.
90. Yoshimura K, Sato K, Aoi N et al. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. **Aesthetic Plast. Surg** 2008;32:48–55.
91. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I et al. expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. **Dis. Colon Rectum** 2009;52:79–86.
92. Tran TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. **Nat Rev Endocrinol** 2010;6:195–213.
93. Caplan AI, Correa D. The MSC: An Injury Drugstore. **Cell Stem Cell** 2011;9:11–15.
94. Puissant B, Barreau C, Bourin P et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **Br J Haematol** 2005;129:118–29.
95. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. **Stem Cells** 2006;24:2582–2591.
96. Kern S, Eichler H, Stoeve J et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. **Stem Cells** 2006;24:1294–1301.
97. Lee RH, Kim B, Choi I et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cell Physiol Biochem** 2004;14:311–324.
98. Niemelä S, Miettinen S, Sarkanen JR et al. Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering Applications. **Topics in Tissue Engineering**, Vol. 4. Capítulo 4. Eds. N Ashammakhi, R Reis, & F Chiellini. 2008.

## Bibliografía

99. Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. **J Craniomaxillofac Surg** 2004; 32:370—373.
100. Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. **J Anim Sci** 2004;82:925–93
101. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. **Circulation** 2004;110:349–355.
102. Cao Y, Sun Z, Liao L et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. **Biochem Biophys Res Commun** 2005;332:370–379.
103. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation** 2004;109:656–663.
104. Rehman J, Traktuev D, Li J et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation** 2004;109:1292–1298.
105. Fraser JK, Schreiber R, Strem B et al. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med** 2006;3 Suppl1:S33–S37.
106. Young C, Jarrell BE, Hoying JB et al. A porcine model for adipose tissue-derived endothelial cell transplantation. **Cell Transplant** 1992;1:293–298.
107. Williams SK, Wang TF, Castrillo R et al. Liposuction-derived human fat used for vascular graft sodding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type. **J Vasc Surg** 1994;19: 916–923.
108. Williams SK, Jarrell BE, Rose DG et al. Human microvessel endothelial cell isolation and vascular graft sodding in the operating room. **Ann Vasc Surg** 1989;3:146 –152.

109. Martínez-Estrada OM, Muñoz-Santos Y, Julve J et al. Human adipose tissue as a source of flk-1 cells: new method of differentiation and expansion. **Cardiovasc Res** 2005;65:328-333.
110. Moon MH, Kim SY, Kim YJ et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. **Cell Physiol Biochem** 2006;17:279-290.
111. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. **Circ Res** 2008;102:77-85.
112. Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. **Circ Res** 2009;104:1410-1420.
113. Hausman GJ and MV Dodson. Stromal vascular cells and adipogenesis: cells within adipose depots regulate adipogenesis. **J Genomics** 2008;1:56-66.
114. Neels JG, Thinnen T, Loskutoff DJ. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. **FASEB J** 2004;18:983-985.
115. Sengenès C, Miranville A, Maumus M et al. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. **Stem Cells** 2007;25:2269-2276.
116. De Francesco F, Tirino V, Desiderio V et al. Human CD34+/CD90+ ASCs Are Capable of Growing as Sphere Clusters, Producing High Levels of VEGF and Forming Capillaries. **PLoS ONE** 2009;4:e6537.
117. Sabin F. Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick (1917). **J Hematother Stem Cell Res** 2002;11(1):5-7.
118. Choi K, Kennedy M, Kazarov A et al. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. **Development** 1998; 125:725-732.

## Bibliografía

119. Zambidis ET, Park TS, Yu W, et al. Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. **Blood** 2008;112(9):3601–3614.
120. Lu SJ, Feng Q, Caballero S, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. **Nat Methods** 2006; 6:501–509.
121. Chung YS, Zhang WJ, Arentson E et al. Lineage analysis of the hemangioblasto as defined by FLK1 and SCL expression. **Development** 2002; 129:5511–5520.
122. Cho SK, Bourdeau A, Letarte M et al. Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. **Blood** 2001;98:3635–3642.
123. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, et al. Identification of the hemangioblasto in postnatal life. **Blood** 2002; 100:3203–3208.
124. Grant M, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. **Nat Med** 2002;8(6):607–612.
125. Miñana MD, Carbonell-Uberos F, Mirabet V et al. IFATS Collection: Identification of hemangioblasts in the adult human adipose tissue. **Stem Cells** 2008;26:2696–2704.
126. Fearn C, Dowdle. The desmoplastic response: induction of collagen synthesis by melanoma cells *in vitro*. **Int J Cancer** 1992;50: 621–627.
127. Jones, EA, Kinsey SE, English A et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. **Arthritis and Rheumatism** 2002;46:3349–3360.
128. Passaniti, A, Taylor RM, Pili R et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. **Lab Invest** 1992;67:519–528.



129. Strawn WB, Richmond RS, Tallant EA et al. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells. **Br J Haematol** 2004;126:120-126.
130. Jokubaitis VJ, Sinka L, Driessen R et al. Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues. **Blood** 2008;111:4055-4063.
131. Bühring HJ, Battula VL, Tremel S et al. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. **Ann N Y Acad Sci** 2007;1106:262-271.
132. De Palma M, Venneri MA, Galli R et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. **Cancer Cell** 2005;8:211-226.
133. Lu K, Lamagna C, Bergers G. Bone marrow-derived vascular progenitors and proangiogenic monocytes in tumors. **Methods Enzymol** 2008; 445:53-82.
134. Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, et al. Angiopoietin-2 Regulates Gene Expression in TIE2-Expressing Monocytes and Augments Their Inherent Proangiogenic Functions. **Cancer Res** 2010; 70:5270-80.
135. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, M Olivetto. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. **Blood** 1993;82:2031 -2037.
136. Danet GH, Pan Y, Luongo JL et al. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. **J Clin Invest** 2003;112:126-135.
137. Cipolleschi MG, D'Ippolito G, BeARNbei PA et al. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. **Exp Hematol** 1997;25:1187-1194.
138. Ivanovi Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F et al. Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. **Transfusion** 2000;40:1482-1488.

## Bibliografía

139. Adelman DM, Maltepe E, Simon MC. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. **Genes Dev** 1999;13:2478–2483.
140. Miller CL, Eaves CJ. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho–myeloid reconstituting ability. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997;94:13648–13653.
141. Sepúlveda P, Encabo A, Carbonell–Uberos F et al. BCL–2 expression is mainly regulated by JAK/STAT3 pathway in human CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells. **Cell Death Differ.** 2007;14:378–391.
142. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. **Cell** 2005;121:1109–1121.
143. Larochelle A, Savona M, Wiggins M et al. Human and rhesus macaque hematopoietic stem cells cannot be purified based only on SLAM family markers. **Blood** 2011;117:1550–1554.
144. Casella I, Feccia T, Chelucci C et al. Autocrine–paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. **Blood** 2003;101:1316–1323.
145. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. **Science** 1999;285:1553–1558.
146. Simmons PJ, Aylett GW, Niutta S et al. Ckit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony–forming cells in stroma–dependent or cytokine–supplemented culture. **Exp Hematol** 1994;22:157–165.
147. Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA–1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995;92:9623–9627.
148. Okumura AJ, Peterson LF. Expression of AML/Runx and ETO/MTG family members during hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. **Exp Hematol** 2007;35:978–988.
149. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA et al. Human embryonic stem cell–derived CD34<sup>+</sup> cells: efficient production in the coculture with OP9

- stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. **Blood** 2005;105:617–626.
150. Han J, Koh YJ, Moon HR et al. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood** 2010;115:957–964.
151. Nakao N, Nakayama T, Yahata T et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Am J Pathol** 177:547–554.
152. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G et al. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. **Nature** 2012;481:457–462.
153. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature** 2010;466:829–834
154. Anker PS, Noort WA, Kruisselbrink AB et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. **Exp Hematol** 2003;31:881– 889.
155. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S et al. Homing of in vitro expanded Stro-1+ or Stro-1- human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. **Blood** 2004;103:3313–3319.
156. Kim SJ, Cho HH, Kim YJ Seo et al. Human adipose stromal cells expanded in human serum promote engraftment of human peripheral blood hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice. **Biochem Biophys Res Commun** 2005;329:25–31.
157. Cousin B, Andre M, AARNud E, Penicaud L, Casteilla L: Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun** 2003;301:1016–1022.
158. Corre J, Barreau C, Cousin B et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. **J Cell Physiol** 2006;208:282–288.

## Bibliografia

159. Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T et al. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. **Mol Cell Biol** 1993;13:473–486.
160. Vittet D, Prandini MH, Berthier R et al. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. **Blood** 1996;88:3424–3431.
161. Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A et al. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. **Development** 1998;125:4575–4583.
162. Hirschi KK. Hemogenic endothelium during development and beyond. **Blood** 2012;119:4823–4827.
163. Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. **Nature** 2009;457:892–895.
164. Lugus JJ, Chung YS, Mills JC et al. GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. **Development** 2007;134:393–405.
165. Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T et al. GATA Switches as developmental drivers. **J Biol Chem** 2010;285:31087–31093.
166. Fujiwara Y, Chang AN, Williams AM et al. Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. **Blood** 2004;103:583–585.
167. Ferreira R, Wai A, Shimizu R et al. Dynamic regulation of Gata factor levels is more important than their identity. **Blood** 2007;109:5481–5490.
168. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. **Blood** 1997;89:3636–3643.
169. Tsai FY, Keller G, Cuo FC et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. **Nature** 1994;371:221–226.

170. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. **PLoS Biol** 2004;2:e301.
171. Tipping AJ, Pina C, Castor A et al. High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle. **Blood** 2009;113:2661-2672.
172. Guo Y, Lübbert M, Engelhardt M. CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. **Stem Cells** 2003;21:15-20.
173. YY Ng, van Kessel B, Lokhorst HM et al. Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. **J Leukoc Biol** 2004;75:314-323.
174. Lacaud G, Kouskoff V, Trumble A et al. Haploinsufficiency of Runx1 results in the acceleration of mesodermal development and hemangioblast specification upon in vitro differentiation of ES cells. **Blood** 2004;103:886-889.
175. Rhodes KE, Gekas C, Wang Y et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. **Cell Stem Cell** 2008;2:252-263.
176. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. **Nature** 2009;457:887-891.
177. North TE, Stacy T, Matheny CJ et al. Runx1 is expressed in adult mouse hematopoietic stem cells and differentiating myeloid and lymphoid cells, but not in maturing erythroid cells. **Stem Cells** 2004;22:158-168.
178. Ichikawa M, Goyama S, Asai T et al. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. **J Immunol** 2008;180:4402-4408.
179. de Bruijn MF, Speck NA. Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. **Oncogene** 2004;23:4238-4248.

## Bibliografia

180. Kuo YH, Zaidi SK, Gornostaeva S et al. Runx2 induces acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfbeta-SMMHC in mice. **Blood** 2009;113:3323-3332.
181. Peschle C, Mavilio F, Care A et al. Haemoglobin switching in human embryos: asynchrony of zeta to alpha and epsilon to gamma-globin switches in primitive and definite erythropoietic lineage. **Nature** 1985;313:235-238.
182. Tavian M, Hallais MF, Peault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. **Development** 1999;126:793-803.
183. Charbord P, Tavian M, Humeau L et al. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of haematopoiesis and its microenvironment. **Blood** 1996;87:4109-4119.
184. Marshall CJ, Moore RL, Thorogood P et al. Detailed characterization of the human aorta-gonad-mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer. **Developmental Dynamics** 1999;215:139-147.
185. Lemischka IR. Microenvironment regulation of hematopoietic stem cells. **Stem Cells** 1997;15 (Suppl. 1):63-68.
186. Palis J. Ontogeny of Erythropoiesis. **Current Opin Hematol.** 2008; 15:155-161.
187. Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood.** 2006;107:435-443.
188. Kingsley PD, Malik J, Emerson RL et al. "Maturation" globin switching in primary primitive erythroid cells. **Blood.** 2006;104:1665-1672.
189. Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS, and Strouboulis J. Erythropoiesis: Model Systems, Molecular Regulators, and Developmental Programs. **IUBMB Life.** 2009;61:800-830.
190. Migliaccio AR. Erythroblast enucleation. **Haematologica** 2010;95:1985-1988.

191. Chang KH, Nelson AM, Cao H et al. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. **Blood** 2006;108:1515–1523.
192. Ma F, Ebihara Y, Umeda K et al. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008;105:13087–13092.
193. Qiu C, Olivier EN, Velho M et al. Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. **Blood** 2008;111:2400–2408.
194. Zhang X, Ma YN, Zhang JW. Human erythroid progenitors from adult bone marrow and cord blood in optimized liquid culture systems respectively maintained adult and neonatal characteristics of globin gene expression. **Biol Res** 2007;40:41–53.
195. Migliaccio AR, Migliaccio G, Brice M et al. Influence of recombinant hematopoietins and of fetal bovine serum on the globin synthetic pattern of human BFUe. **Blood** 1990;76:1150–1157.
196. Bohmer RM, Campbell TA, Bianchi DW. Selectively increased growth of fetal hemoglobin-expressing adult erythroid progenitors after brief treatment of early progenitors with transforming growth factor beta. **Blood** 2000;95:2967–2974.
197. Bohmer RM, Zhen D, Bianchi DW. Differential development of fetal and adult haemoglobin profiles in colony culture: isolation of fetal nucleated red cells by two-colour fluorescence labelling. **Br J Haematol** 1998;103:351–360.
198. Narayan AD, Ersek A, Campbell TA et al. The effect of hypoxia and stem cell source on haemoglobin switching. **Br J Haematol** 2005;128:562–570.
199. Risso A, Fabbro D, Damante G et al. Expression of fetal hemoglobin in adult humans exposed to high altitude hypoxia. **Blood Cells Mol Dis** 2012;48:147–153.

## Bibliografia

200. Lodish HF. Alpha and beta globin messenger ribonucleic acid. Different amounts and rates of initiation of translation. **J Biol Chem** 1971;246:7131–7138.
201. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovasc Res** 2001;9:507–521.
202. van der Bilt JD, Borel Rinkes IH. Surgery and angiogenesis. **Biochim Biophys Acta** 2004;54:95–104.
203. Malinda KM. *In vivo* matrigel migration and angiogenesis assay. **Methods Mol Biol** 2009;467:287–294.
204. Hasan J, Shnyder SD, Bibby M et al. Quantitative angiogenesis assays *in vivo*—a review. **Angiogenesis** 2004;7:1–16.
205. Mould AW, Greco SA, Cahill MM et al. Transgenic Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor–B Isoforms by Endothelial Cells Potentiates Postnatal Vessel Growth In Vivo and In Vitro. **Circ Res** 2005;97:e60–e70.
206. Woodman SE, Ashton AW, Schubert W et al. Caveolin-1 Knockout Mice Show an Impaired Angiogenic Response to Exogenous Stimuli. **Am J Pathol** 2003;162:2059–2068.
207. Presta M, Dell’Era P, Mitola S et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev** 2005;16:159–78.
208. Underwood PA, Bean PA, Gamble JR. Rate of endothelial expansion is controlled by cell:cell adhesion. **Int J Biochem Cell Biol** 2002;34:55–69.
209. Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L et al. Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. **Am J Pathol** 2006; 168:529–41.
210. Al-Khaldi A, Eliopoulos N, Martineau D et al. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. **Gene Therapy** 2003;10:621–629.



211. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A et al. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. **Blood** 2007;109:4761-4768.
212. Zcharia E, Jia J, Zhang X et al. Newly Generated Heparanase Knock-Out Mice Unravel Co-Regulation of Heparanase and Matrix Metalloproteinases. **PLoS ONE** 2009;4(4)e5181.
213. Cheng WF, Hung CF, Chai CY et al. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a ADN vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. **J Clin Invest** 2001;108:669-678.
214. Zeng H, Qin L, Zhao D et al. Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity. **J Exp Med** 2006;203:719-729.
215. Adini A, Fainaru O, Udagawa T et al. Matrigel cytometry: A novel method for quantifying angiogenesis in vivo. **J Immunological Methods** 2009;342:78-81.
216. Valapala M, Thamake SI, Vishwanatha JK. A competitive hexapeptide inhibitor of annexin A2 prevents hypoxia-induced angiogenic events. **J Cell Sci** 2011;124:1453-1464.
217. Claffey KP, Abrams K, Shih SC et al. Fibroblast Growth Factor 2 Activation of Stromal Cell Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Angiogenesis. **Lab Invest** 2001;81:61-75.
218. Kawaguchi N, Toriyama K, Nicodemou-Lena E et al. De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast grow factor. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1998;95:1062-1066.



## ***APÉNDICE***



**APÉNDICE**

- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA):** Sigma–Aldrich Corp.
- **Agarosa (Bajo EEO):** Sigma–Aldrich Corp.
- **Agua DEPC:** Invitrogen, Life Technologies.
- **Anfotericina:** Sigma–Aldrich Corp.
- **Anti–CD31 murino:** BD Pharmingen.
- **Anti–CD45 humano:** Abcam, Cambridge, UK.
- **Anti–óxido nítrico sintasa endotelial humana (eNOS):** Abcam.
- **β–Mercaptoetanol:** Gibco, Life Technologies.
- **BAMBANKER:** Nippon GENETICS Europe GmbH, Düren Germany
- **Banda de pesos moleculares O´Range Ruler (50pb):** Fermentas, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA.
- **Bromuro de etidio (1%):** Sigma–Aldrich Corp.
- **Cámara fotográfica de color LEICA DFC480:** Leica Microsystems.
- **Cloruro de Amonio (NH<sub>4</sub>Cl):** Sigma–Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA.
- **Colagenasa tipo I:** Gibco, Life Technologies, Carlsbad CA, USA.
- **Dimetilsulfóxido (DMSO):** Sigma–Aldrich Corp.
- **EBM (medio basal de crecimiento de endotelio):** LONZA.
- **EGM–2MV (medio de crecimiento de endotelio–2):** LONZA, Basel, Switzerland.
- **Enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*:** Applied Biosystems, Life Technologies.
- **Eritropoyetina (EPO):** R&D Systems.
- **Etanol 75º:** Sigma Aldrich Corp.
- **Factor de crecimiento de células de troncales (SCF):** R&D Systems.
- **Factor estimulante de colonias granulocíticas (G–CSF):** R&D Systems.

Apéndice

- **Factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF):** R&D Systems.
- **Ficoll-Paque PLUS™:** StemCell Technologies, Grenoble, France.
- **Flt-3 ligand (FL):** R&D Systems.
- **Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>):** Sigma-Aldrich Corp.
- **Gentamicina:** Sigma-Aldrich Corp.
- **Hematoxilina de Harris:** Merck.
- **Interleucina-3 (IL-3):** R&D Systems.
- **Interleucina-6 (IL-6):** R&D Systems, Abingdon, UK.
- **Isopropanol:** Sigma Aldrich Corp.
- **Kit de detección IgG HRP Detection Kit:** BD Pharmingen.
- **Kit de revelado LSLAB+:** Dako.
- **Lipoproteínas de Cappel:** MP Biomedicals LLC, Solon OH, USA.
- **Microscopio LEICA DM-IRE2:** Leica Microsystems, Wetzlar, Germany.
- **NanoDrop Spectrophotometer ND-1000:** Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA.
- **Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3%:** Sigma Aldrich Corp.
- **Placas 24 pocillos:** BD Falcon™.
- **Placas Petri 35mm:** BD Falcon™ .Franklin Lakes, NJ, USA.
- **Seroalbúmina bovina (BSA):** Sigma-Aldrich Corp.
- **Single Quots®:** LONZA.
- **Sistema de documentación de geles G-BOX:** Syngene, Synoptics Ltd, Cambridge, UK.
- **Solución de recuperación de antígenos Antigen Retrieval:** Dako, Carpinteria, CA, USA ).
- **StemSpan:** Stem Cell Technologies.
- **Suero fetal bovino (FBS):** Sigma Aldrich Corp.
- **Suero fetal bovino (FBS):** Sigma-Aldrich Corp.

- **Tampón de carga:** AppliChem, Darmstadt, Germany.
- **Tampón fosfato salino (PBS):** Sigma–Aldrich Corp.
- **Tampón tris–acetato–EDTA (TAE):** Sigma–Aldrich Corp.
- ***TaqMan Gene Expression Assays***®: Applied Biosystems, Life Technologies.
- ***TaqMan Universal Mastermix***®: Applied Biosystems, Life Technologies.
- ***TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit:*** Applied Biosystems, Life Technologies.
- **Termociclador 9800 Fast Thermal Cycler:** Applied Biosystems, Life Technologies.
- **Termociclador *HT7900 Fast Real–Time PCR System:*** Applied Biosystems, Life Technologies.
- **TRIzol® Reagent:** Invitrogen, Life Technologies.
- **Trombopoyetina (TPO):** R&D Systems.

