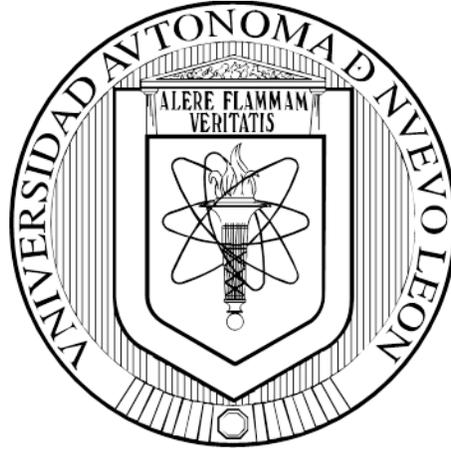


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS  
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO  
ADIPOSO**

**PRESENTA  
M.C.P. LEYLA LETICIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**JUNIO, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS  
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO  
ADIPOSO**

**PRESENTA  
M.C.P. LEYLA LETICIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**JUNIO, 2019**

# **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO”**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dra. Odila Saucedo Cárdenas**

**Director de tesis**



---

**Dra. María de Jesús Loera Arias**

**Co-director de tesis**



---

**Dr. José Juan Pérez Trujillo**

**Comisión de tesis**



---

**Dr Med. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de estudios de posgrado**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES  
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO**

Presentado por:

**M.C.P. Leyla Leticia Sánchez Sánchez**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y bajo la co-dirección de la Dra. María de Jesús Loera Arias.



---

**Dra. Odila Saucedo Cárdenas**

Director de tesis



---

**Dra. María de Jesús Loera Arias**

Co-director de tesis

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Eberardo y Leticia, por ser mi gran soporte, apoyo incondicional y gran motivación.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas, por su gran calidad humana, sus enseñanzas académicas y no académicas, valiosas horas de apoyo, paciencia y entrega a este trabajo y por ser parte de mi formación.

Al Dr. Roberto Montes de Oca, por su gran dedicación, invaluable apoyo y gran amor a la formación de investigadores.

A la Dra. María de Jesús Loera Arias, por su extraordinaria vocación de enseñanza y por todas sus sugerencias y aportaciones.

Al Dr. Jose Juan Pérez Trujillo por colaborar y engrandecer este trabajo con cada una de sus enseñanzas.

A la Dra. Aracely García y al Dr. Humberto Rodríguez por su gran labor de enseñar y dirigir a las nuevas generaciones.

A Sheila, por su amistad, apoyo y todas y cada una de las cosas que me enseñó fuera y dentro del laboratorio. A Laura, por su amistad y confianza.

A Miguel, por su apoyo, comprensión y paciencia, por vivir conmigo esta etapa desde el inicio, por siempre mostrarme el lado más bonito de cada día y, sobre todo, por siempre hacerme sonreír.

A mis compañeros del laboratorio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste IMSS y del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina UANL.

A mis amigos que siempre me acompañaron y que seguirán siendo parte de mi vida.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo para la realización de este proyecto.

## ÍNDICE

<b>Lista de figuras .....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>8</b>
<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>10</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>12</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>13</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>14</b>
<b>Terapia Celular .....</b>	<b>14</b>
<b>Enfoques de terapia celular .....</b>	<b>15</b>
<b>Terapia celular autóloga .....</b>	<b>15</b>
<b>Terapia celular alogénica .....</b>	<b>16</b>
<b>Tipos celulares utilizados en terapia celular .....</b>	<b>16</b>
<b>Células madre embrionarias.....</b>	<b>17</b>
<b>Células madre mesenquimales adultas.....</b>	<b>18</b>
<b>Terapia celular con células madre mesenquimales adultas.....</b>	<b>19</b>
<b>Células madre mesenquimales de médula ósea.....</b>	<b>19</b>
<b>Células madre mesenquimales de cordón umbilical.....</b>	<b>19</b>
<b>Células madre mesenquimales de tejido adiposo.....</b>	<b>20</b>
<b>Terapia génica con células madre mesenquimales .....</b>	<b>20</b>
<b>El tejido adiposo como fuente de células madre mesenquimales.....</b>	<b>22</b>
<b>Ventajas de la utilización de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo .....</b>	<b>23</b>
<b>Uso de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en terapia celular .....</b>	<b>24</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>25</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>26</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>27</b>
<b>Estrategia experimental.....</b>	<b>27</b>

<b>Material y equipo.....</b>	<b>28</b>
<b>Material de laboratorio .....</b>	<b>28</b>
<b>Material biológico .....</b>	<b>28</b>
<b>Equipo.....</b>	<b>28</b>
<b>Soluciones.....</b>	<b>28</b>
<b>Reactivos.....</b>	<b>29</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>30</b>
<b>Aislamiento de células mesenquimales de muestras de lipoaspirados.....</b>	<b>30</b>
<b>Caracterización de células mesenquimales aisladas de tejido adiposo por medio de técnicas histológicas .....</b>	<b>31</b>
<b>Caracterización de células mesenquimales.....</b>	<b>31</b>
<b>Inmunofluorescencia .....</b>	<b>31</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>33</b>
<b>Establecimiento de cultivos primarios de células mesenquimales a partir de muestra de lipoaspirado .....</b>	<b>33</b>
<b>Características fenotípicas de las células mesenquimales cultivadas..</b>	<b>35</b>
<b>Determinación de marcadores específicos y de pluripotencialidad en células mesenquimales aisladas de tejido adiposo.....</b>	<b>40</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>46</b>
<b>Aportaciones y perspectivas.....</b>	<b>46</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>47</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>53</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Tipos de trasplante.....	15
<b>Figura 2.</b> Tipos de terapia celular.....	21
<b>Figura 3.</b> Determinación de viabilidad de lipoaspirado.....	33
<b>Figura 4.</b> Establecimiento de cultivos primarios de células mesenquimales.....	34
<b>Figura 5.</b> Morfología de células mesenquimales aisladas de lipoaspirados.....	35
<b>Figura 6.</b> Análisis morfológico de cel. mesenquimales de distintas pacientes.....	36
<b>Figura 7.</b> Determinación de $\beta$ actina, calnexina y enolasa.....	37
<b>Figura 8.</b> Análisis de la presencia de matriz extracelular.....	38
<b>Figura 9.</b> Ausencia de senescencia en células mesenquimales cultivadas en pasajes tempranos .....	39
<b>Figura 10.</b> Determinación de marcadores específicos de células mesenquimales aisladas de tejido adiposo.....	40
<b>Figura 11.</b> Determinación de marcadores de pluripotencialidad.....	42

## Lista de Tablas

Tabla 1. Análisis comparativo entre diversas fuentes de células mesenquimales.....	26
--	----

## Lista de abreviaturas

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-DiAmida-2-Fenidol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Medio Dulbecco modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium, por sus siglas en inglés)
SFB	Suero fetal bovino
mg	Miligramo
Min	Minuto
ml	Mililitro
rpm	Revoluciones por minuto
<i>g</i>	Gravedades
TBS	Buffer Tris Salino (Tris Buffered Saline, por sus siglas en inglés)
TBS-T	Buffer Tris Salino + Tween 20 (Tris Buffered Saline + Tween 20, por sus siglas en inglés)
UV	Ultravioleta
PBS	Buffer salino fosfatado (Phosphate Buffer Saline, por sus siglas en inglés)
PAS	Ácido peryódico Schiff (Periodic Acid- Schiff, por sus siglas en inglés)
MSCs	Células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells, por sus siglas en inglés)
ESCs	Células madre embrionarias (Embryonic Stem Cells, por sus siglas en inglés)

HSCs	Células madre hematopoyéticas, (Hematopoietic Stem Cells, por sus siglas en inglés)
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
TA	Tejido adiposo
HLA	Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen, por sus siglas en inglés)
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos

## RESUMEN

M.C.P. Leyla Leticia Sánchez Sánchez  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Fecha de titulación:** Junio 2019

**Título del estudio:** AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS  
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO

**Páginas del estudio:** 59

**Área del estudio:** Morfología **Candidato para el  
grado de Maestría en Ciencias con Orientación  
en Morfología**

**Propósito y método del estudio:** La terapia celular se puede definir como el uso de células para el tratamiento de distintas enfermedades. El objetivo del presente trabajo, es aislar y caracterizar células mesenquimales obtenidas del tejido adiposo de diferentes pacientes. Se estableció un cultivo primario de células mesenquimales obtenidas de lipoaspirados. Posteriormente se analizaron las características fenotípicas de las células mesenquimales cultivadas. Se determinaron marcadores específicos y de pluripotencialidad.

**Conclusiones y contribuciones:** Los cultivos obtenidos de muestras de diferentes pacientes mostraron las características fenotípicas propias de cultivos de células madre mesenquimales no hematopoyéticas hasta el séptimo pasaje. Así también, se logró corroborar que dichas células expresan marcadores de superficie y factores de transcripción característicos de pluripotencialidad. Las células madre mesenquimales aisladas de lipoaspirados, representan una fuente valiosa como herramienta terapéutica para diversas enfermedades.

**Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas**  
Director

## Abstract

### **Title of the study: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MESENCHYMAL CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE**

**Purpose and method of the study:** Cell therapy is defined as the use of cells for the treatment of different diseases. The objective of this study is to isolate and characterize mesenchymal cells obtained from the adipose tissue of different patients. A primary culture of mesenchymal cells obtained from lipoaspirates was established. Subsequently, the phenotypic characteristics of the cultured mesenchymal cells were analyzed. Specific markers and pluripotency were determined.

**Conclusions and contributions:** The cell cultures obtained from the samples of different patients showed phenotypic characteristics of non-haematopoietic mesenchymal stem cell cultures up to the seventh passage. Likewise, it was possible to corroborate that these cells express surface markers and transcription characteristic factors of pluripotency. Mesenchymal stem cells isolated from lipoaspirates represent a valuable source as a therapeutic tool for various diseases. The obtained cultures of mesenchymal stem cells will allow advance in the genetic modification of these cells for therapeutic purposes for future studies.

# INTRODUCCIÓN

Los procedimientos de trasplante de células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) se han utilizado desde la década de 1960 para el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, el uso potencial de las MSCs todavía está limitado, ya que quedan muchos obstáculos por superar antes de que puedan usarse regularmente para terapias personalizadas (Baksh, 2004).

El aislamiento de MSCs a partir de tejido de adultos es ventajoso sobre las células madre embrionarias debido a los aspectos éticos e inocuidad inmunológica. Las MSCs se diferencian en múltiples linajes celulares con la ayuda de factores de diferenciación apropiados. Se han identificado fuentes de células madre el tejido adiposo, pulpa dental y leche materna (DeFrancesco, 2012).

El tejido adiposo (TA) ya no solo se considera un reservorio de energía, aislante térmico o amortiguador mecánico, sino que se ha destacado su participación en una compleja red de interacciones con los sistemas endócrino, nervioso y cardiovascular (Panna Tandon, Wafer, & Minchin, 2018).

Las MSCs derivadas de TA tienen un gran potencial para ser utilizadas en terapia celular gracias a las diferentes ventajas que presentan, como son su facilidad de aislamiento, cinética de crecimiento, plasticidad y propiedades tróficas. Además, las MSCs derivadas de TA se pueden manipular genéticamente y modular epigenéticamente (Bourin et al., 2013).

# ANTECEDENTES

## 1. Terapia Celular

El uso de células en el tratamiento de enfermedades se ha encontrado desde tiempos antiguos. En la India, se encontró evidencia de un injerto de piel de hace aproximadamente 3000 años (Hauben, Baruchin, & Mahler, 1982). El rápido progreso de este tipo de terapia trajo como consecuencia el primer trasplante exitoso de riñón en 1954, seguido en 1956 del primer trasplante de médula ósea (Bloom et al 2005).

El campo de la terapia celular está avanzando rápidamente y existen algunos protocolos clínicos que se encuentran en fase III, particularmente para tratar patologías cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca y la enfermedad isquémica así como enfermedades hematológicas (DeFrancesco, 2012; Syed & Evans, 2013).

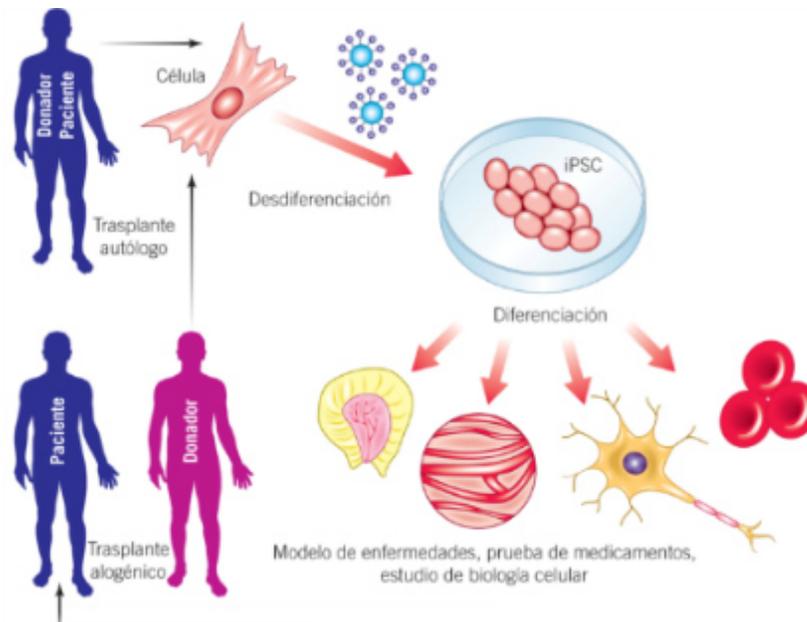
Con el incremento de la necesidad de proveer mejores opciones terapéuticas a las actualmente disponibles, las terapias celulares se han convertido en el objetivo de múltiples investigaciones dirigidas hacia enfermedades que tienen una gran necesidad médica, como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas.

Otra de las enfermedades que ha cobrado relevancia en investigaciones con terapia celular es la Diabetes, enfermedad con gran impacto a nivel mundial afectando a países tanto del primer como de tercer mundo (Trounson, et al 2011). El potencial curativo de la terapia celular es lo que le diferencia de tratamientos que actualmente se encuentran disponibles y que no brindan una restauración de la función celular perdida (Malik & Durdy, 2014).

La terapia celular se puede definir como el uso de células como tratamiento para distintas enfermedades (Figura 1). Las células pueden ser de distintos tipos, como células madre o células diferenciadas (Malik & Durdy, 2014).

## 2. Enfoques en terapia celular

Existen dos enfoques para la terapia celular (Figura 2): la terapia celular autóloga, donde las células derivan de las propias células del paciente y la terapia celular alogénica, donde la terapia celular deriva de células que no son del mismo paciente (Malik & Durdy, 2014).



**Figura 1.** Tipos de trasplante. (Sandoval-Rodríguez, Meza-Ríos, García-Bañuelos, & Armendáriz-Borunda, 2016)

En la actualidad, no se ha establecido un modelo de terapia celular ideal, es decir, si ésta deba ser de forma autóloga o alogénica. Conforme se realicen un mayor número de estudios se podrá identificar el tipo de terapia más conveniente desde el punto de vista clínico y farmacoeconómico.

### A. Terapia celular autóloga

Es la obtención de células del propio paciente para trasplantarse en él posteriormente. Tiene el inconveniente que en el grupo de células obtenidas se encuentren células tumorales contaminantes, en caso de que la terapia celular se realice por alguna mielodisplasia, por mencionar un ejemplo. A diferencia del alotrasplante, el trasplante autólogo no tiene

el inconveniente de la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Este tipo de terapia se inició casi al mismo tiempo que el trasplante alogénico (McGovern, Russel, Atkins, & Webster, 1959), pero los primeros resultados detuvieron su desarrollo hasta la mejoría de los tratamientos de quimioterapia, siendo actualmente el tratamiento de elección en el campo de la hemato-oncología (Unzué, 2006).

### **B. Terapia celular alogénica**

Ocurre cuando se aíslan células de un individuo para trasplantarse en otro individuo con carga genética diferente pero con una mayor identidad en los antígenos del sistema HLA (Antígeno leucocitario humano, por sus siglas en inglés *Human Leucocyte Antigen*). Los genes del HLA se encuentran en el cromosoma 6 y se heredan como haplotipos, de forma que la probabilidad de ser HLA idénticos de 2 hermanos es del 25%. Otros familiares se pueden encontrar en un donante familiar compatible en un tercio de los pacientes (Unzué, 2006).

## **3. Tipos celulares utilizados en terapia celular**

Las células madre ocupan una posición especial en la jerarquía celular durante la diferenciación y el desarrollo de cualquier organismo. Estas células indiferenciadas tienen el potencial de formar cualquier otro tipo de célula con función especializada y se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y diferenciación. Ambas propiedades celulares son requisitos para el éxito de la medicina regenerativa actual (Singh, 2014).

### **A. Clasificación de las células madre de acuerdo a su potencialidad.**

Dependiendo del potencial para diferenciarse en un linaje particular, las células madre se agrupan en cinco tipos (Thomson, Itskovitz-Eldor, & Shapiro, 1998) :

- *Totipotentes*: una célula única capaz de dividirse y formar varias células diferenciadas, incluidos los tejidos extraembrionarios; ejemplo, el cigoto.
- *Pluripotentes*: tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. La incapacidad para formar tejidos extraembrionarios como la placenta es la única limitación que los hace inferiores a las células madre totipotentes; ejemplo: las células madre embrionarias (*ESC, Embryonic Stem Cells*).
- *Multipotentes*: muestran un patrón restringido de diferenciación para unos pocos linajes, por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (*HSC, Hematopoietic Stem Cell*) o las derivadas de tejido adiposo.
- *Oligopotentes*: son capaces de diferenciarse en pocos tipos de células de linajes específicos, como las células madre linfoides, que pueden diferenciarse solo en basófilos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y trombocitos.
- *Unipotentes*: solo pueden diferenciarse en un tipo de célula en particular; por ejemplo, los hepatoblastos que dan origen a hepatocitos.

## **B. Células Madre Embrionarias (ESCs)**

Las ESCs conforman un conjunto de 50-150 células en el interior del blastocisto, el cual se forma en el periodo de pre-implantación embrionaria que ocurre habitualmente 4 a 5 días después de que un oocito ha sido fecundado por el espermatozoide (González López, 2009).

Las ESCs se han propuesto como un tipo candidato a terapia celular debido a su plasticidad y capacidad ilimitada de autorrenovación durante un periodo prolongado de tiempo sin sufrir diferenciación. Las ESCs forman parte de la innovadora medicina regenerativa (Malik & Durdy,

2014) en el reemplazo de tejidos después de que ocurre una lesión, enfermedad o en el mismo envejecimiento. Una de las grandes ventajas de las células madre embrionarias es que pueden diferenciarse en todos los tipos celulares de las tres capas germinales, y que pueden mantenerse en cultivos celulares por largo tiempo (Gonzalez Lopez, 2009). Sin embargo, actualmente existe controversia debido a los problemas éticos que implica la terapia celular con ESCs humanas (Lee, Park, & Kim, 2004), así como de existir el riesgo que se produzca una EICH.

### **C. Células Madre Mesenquimales Adultas**

Cada órgano en el cuerpo humano adulto alberga una pequeña población de células madre que tienen la función de mantener la homeostasis del tejido donde residen. Estas *células madre adultas* permanecen en estado inactivo o indiferenciado hasta que son activadas por algún estímulo y tienen una capacidad limitada para diferenciarse en linajes específicos (Singh, 2014). Los tipos más comunes son las células madre hematopoyéticas, MSCs, células madre neuronales, células madre umbilicales, células madre cardíacas y células madre de la retina, todas residen en sus respectivos tejidos. A diferencia de las ESCs, las células madre adultas no requieren una capa de alimentación o células de soporte para su crecimiento y, por tanto, son más fáciles de aislar, utilizando diferentes medios y factores de crecimiento (Singh, 2014). Otra de las ventajas es que no presentan el riesgo de desarrollar un teratoma y, por lo tanto, son preferibles en la medicina regenerativa y en la terapia con células madre. Sin embargo, los rechazos inmunitarios de las células madre adultas plantean aún serios desafíos en ciertos casos. Dentro de sus características están su fácil adherencia a superficies plásticas, formación de colonias, así como su singular forma ahusada o muy similar al fibroblasto.

#### **4. Terapia celular con células madre mesenquimales adultas**

La médula ósea fue la primera fuente de donde se aislaron MSCs (Baksh, 2004). Sin embargo las MSCs también han sido aisladas de otros tejidos como el hueso trabecular (Noth et al., 2002), tejido adiposo, líquido sinovial, músculo, pulmón y células perivasculares del cordón umbilical humano derivadas de la gelatina de Wharton (Sarugaser, Lickorish, Baksh, Hosseini, & Davies, 2004). Estos hallazgos revelan que las MSCs se distribuyen de manera diversa *in vivo*, por lo que el aislamiento de las MSCs no está restringido a un sólo tejido como fuente de obtención. Enseguida se describen las células madre mesenquimales de diversas fuentes de tejido:

##### **A. Células madre mesenquimales de médula ósea**

Se pensó originalmente que el estroma de la médula ósea funcionaba principalmente como un soporte estructural para las células progenitoras ahí residentes. (Gnecchi & Melo, 2009). En la médula ósea, las MSCs representan aproximadamente el 0.001-0.002% de las células nucleadas. A pesar de que las MSCs son escasas, fácilmente pueden ser separadas de las células madre hematopoyéticas (HSC) en cultivo por su capacidad de adherirse a superficies de plástico (Prockop, 1997) y pueden ser fácilmente cultivadas *ex vivo*.

##### **B. Células madre mesenquimales de cordón umbilical**

Las MSCs de cordón umbilical tienen la capacidad de autorrenovarse y son pluripotentes, es decir, pueden diferenciarse hacia líneas celulares no mesenquimales, incluidos los derivados de ectodermo (astrocitos, oligodendrocitos, neuronas) y hepatocitos endodérmicos (Nagamura-Inoue & He, 2014) (Ullah, Subbarao, & Gyu, 2015) (J. Chen, Mou, & Du, 2015). También se ha reportado la diferenciación de células madre del cordón umbilical hacia cardiomiocitos (Polchow, Kebbel, & Schmiedeknecht, 2012). Las células madre mesenquimales se aíslan de la gelatina de Wharton, mientras que las células epiteliales, se obtienen

de las capas internas y externas del cordón umbilical (Nagamura-Inoue & He, 2014);(Cardoso, Ferrari, & Garcia, 2012).

### **C. Células mesenquimales de tejido adiposo**

Las MSCs están presentes en gran cantidad en el tejido adiposo y éste puede obtenerse a partir de un procedimiento quirúrgico: la cirugía de liposucción, ya que el lipoaspirado obtenido es considerado un producto de desecho. La disponibilidad de células madre en TA es mucho mayor comparado con la médula ósea ya que las MSCs de tejido adiposo comprenden aproximadamente el 2% de las células nucleadas en una muestra de lipoaspirado en comparación con un 0.001-0.002% en médula ósea (Doran, 2015) (Gnecchi & Melo, 2009). El número de células madre por mililitro de lipoaspirado es aproximadamente ocho veces mayor que en la médula ósea y el volumen de lipoaspirado obtenido típicamente bajo anestesia local es al menos cinco veces mayor que el que puede obtenerse de la médula ósea (Strem, Hicok, & Zhu, 2005).

## **5. Terapia génica con células madre mesenquimales**

Una de las mayores perspectivas de las MSCs para utilizarse en terapia celular es el proporcionar un apoyo estromal al tejido afectado donde se plantea utilizar como terapia. Si bien, rara vez se diferencian en el parénquima tisular (Y. Chen et al., 2007), las MSCs podrían contribuir a la regeneración del estroma y seguir ejerciendo su función como célula mesenquimal.

Actualmente, las herramientas de biología molecular nos han permitido el desarrollo de terapias de reemplazo o de restablecimiento de la función celular mediante la inserción del gen de la proteína de interés en células para inducir su producción *in vitro* e *in vivo* (Bielke & Erbacher, 2010) (Figura 3). Por lo que la idea de combinar el uso de las MSCs con la edición génica de interés clínico se convierte en una estrategia muy prometedora en terapia celular. Esto es, se podrían generar células que, además de expresar la proteína de interés, presenten la capacidad de

diferenciarse a diferentes linajes celulares para mejorar su adaptación al tejido diana donde se requiere la restauración funcional de determinado tipo celular.

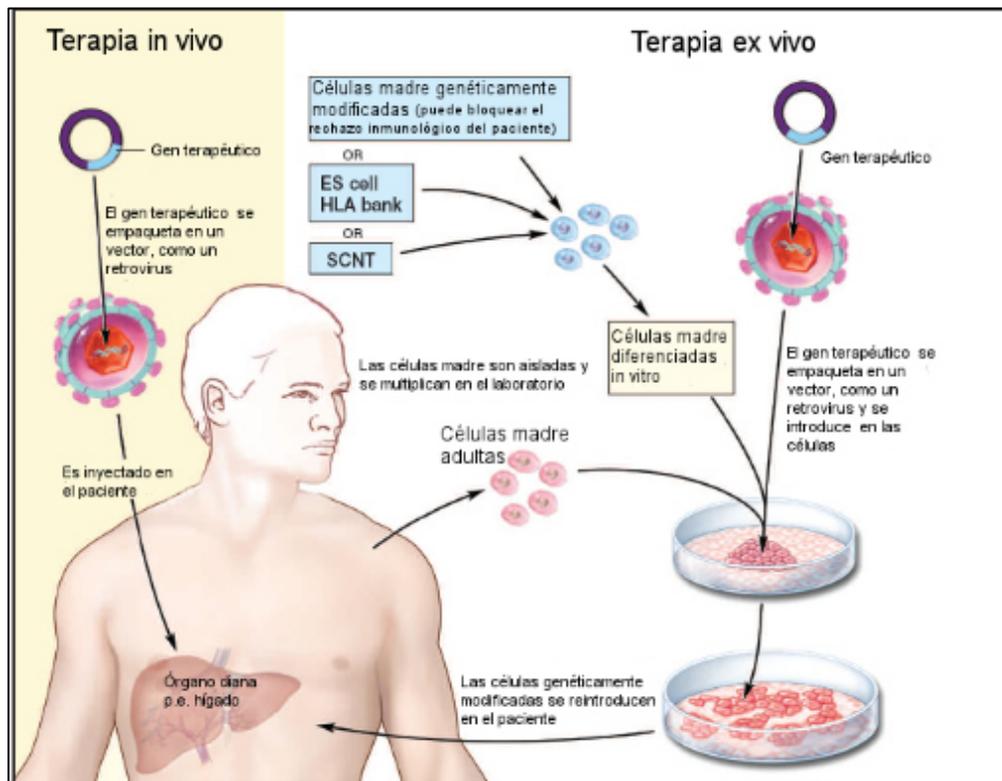


Figura 2. Tipos de terapia celular (Machado, 2012)

La terapia génica es una estrategia terapéutica novedosa y prometedora para el tratamiento de múltiples enfermedades hereditarias y no hereditarias, incluidas infecciones, trastornos crónico-degenerativos y neoplásicos (Anderson, 1992) (Matar et al., 2009).

La posibilidad de manipular células *ex vivo* utilizando estrategias de terapia génica con el objetivo de trasplantarlas en el paciente ha generado mucha atención. Este enfoque, que combina terapia génica y celular se ha propuesto como un tipo de terapia potencial (Allay et al., 1997) (Matthews & Keating, 1996). Los experimentos iniciales sobre la expresión del transgén mediada por virus en las MSCs mostraron una transducción de células eficiente con vectores retrovirales que expresan los genes LacZ o IL-3, y sin cambios en potencial de diferenciación de MSCs después de la transferencia de genes (Allay et al., 1997).

Así también, las MSCs han sido ampliamente estudiadas como acarreadoras de genes en desórdenes hepáticos (Aquino, Bolontrade, García, Podhajcer, & Mazzolini, 2010), cardíacos (A. Singh, Singh, & Sen, 2016) y en células de sostén de diversos tejidos (Mohammadian, M. Abasi, E. Akbarzadeh, 2015).

## **6. El tejido adiposo como fuente de células madre mesenquimales**

De acuerdo con la Federación Internacional de Terapéutica y Ciencia Adipogénica (Bourin et al., 2013), las MSCs aisladas de tejido adiposo, parecen ser ideales en aplicaciones de medicina regenerativa por muchas razones: pueden ser cultivadas *ex vivo*, manipuladas y aumentadas en número de una manera no invasiva, fácil y efectiva.

El tejido adiposo es un órgano con características únicas desde el punto de vista morfológico, cuya principal función es el almacenamiento de lípidos en respuesta al estado de energía de un organismo. El TA no sólo funciona como reservorio de energía, sino también se encuentra implicado en múltiples funciones fisiológicas (P Tandon, Wafer, & Minchin, 2018). El TA se distribuye en todo el cuerpo humano y se clasifica en tejido adiposo blanco (entre el músculo y la piel) y tejido adiposo pardo (también llamado marrón) asociado con órganos viscerales. Los adipocitos tienen diferente localización y tamaño. Entre los adipocitos, se constituye el estroma vascular, donde se encuentran preadipocitos, macrófagos, MSCs y células endoteliales (P Tandon et al., 2018).

Aunque los estudios son limitados, se reporta que existen diferencias entre los diferentes depósitos de tejido adiposo en cuanto al número de células madre que contienen. Mientras que en modelos murinos las células madre son abundantes en el tejido adiposo blanco, su número y potencial de diferenciación se reducen en el tejido adiposo pardo (Schipper, Marra, & Rubin, 2006). En seres humanos, se han observado diferencias en cuanto al número de MSCs obtenidas según la región anatómica, reportándose un mayor número en el área del brazo comparado con el muslo y abdomen (Schipper et al., 2006). Además, se ha reportado existen diferencias con respecto al número de preadipocitos y de células endoteliales en

los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo y omental en humanos (Van Harmelen, Rohrig, & Hauner, 2004).

Como ya se ha descrito anteriormente, las MSCs aisladas de tejido adiposo, son células progenitoras multipotentes adultas con potencial de autorrenovación y la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células especializadas. Dado que no hay un biomarcador único disponible para la identificación de MSCs humanas, un conjunto de marcadores y características celulares fue propuesto por la Sociedad Internacional de Terapia Celular en 2006 (Dominici et al., 2006).

Los criterios mínimos de MSCs aún son ampliamente aceptados en la actualidad e incluyen:

- i. La capacidad de autorrenovación
- ii. Diferenciación hacia los linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos
- iii. Expresión de un conjunto característico de marcadores de superficie, como CD73, CD90 y CD105 y carecer de expresión de CD14, CD34, CD45 y antígeno de leucocitos humanos DR (HLA-DR) (Bourin et al., 2013).

## 7. Ventajas de la utilización de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Enseguida se presenta una tabla donde se comparan distintos puntos parámetros en cuanto a las distintas fuentes de células madre mesenquimales.

	Tejido adiposo	Médula ósea	Cordón umbilical
Obtención de la muestra	✓	✗	✗
Aspectos éticos y legales	✓	✓	✗
Cantidad de células	✓	✗	✗
Eficacia de transfección	✓	✓	—

**Tabla 1. Análisis comparativo entre diversas fuentes de células mesenquimales.** (Haleem-Smith, Derfoul, & Okafor, 2005) (Yoshimura et al., 2007) (Madeira et al., 2010) (Zuk et al., 2002).

## **8. Uso de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en terapia celular**

Utilizando esta prometedora población celular, estudios recientes han explorado la seguridad y eficacia de MSCs aisladas de tejido adiposo en varios modelos animales.

La ingeniería tisular se ha utilizado en la reparación de piel, utilizando células madre mesenquimales aisladas de tejido adiposo (Auger, Berthod, Moulin, Pouliot, & Germain, 2004) (De Luca, Pellegrini, & Green, 2006). Los sustitutos de la piel de dos capas, que incluyen la epidermis y la dermis, se han vuelto fundamentales en el desarrollo de matrices dérmicas en los últimos años junto con los fibroblastos autólogos que ayudan en el mecanismo de reparación de la cicatrización de heridas por quemaduras (Lamme, Van Leeuwen, Brandsma, Van Marie, & Middelkoop, 2000). Trottier y cols. definieron el mecanismo para producir nuevos sustitutos de piel humana a partir de queratinocitos y MSCs aisladas de tejido adiposo *in vitro* sin el soporte de andamios exógenos o sintéticos (Trottier, Marceau-Fortier, Germain, Vincent, & Fradette, 2008). Estos sustitutos mostraron características similares a nivel histológico y por inmunohistoquímica a los sustitutos de fibroblastos dérmicos.

Kajiyama y cols. transfectaron MSCs aisladas de tejido adiposo con el gen Pdx1 (regulador clave del desarrollo pancreático normal y diferenciación de células beta) y lograron su diferenciación en células productoras de insulina en un modelo murino de DM2. Por otra parte, Forouzanfar y cols. utilizaron MSCs derivadas de tejido adiposo transfectadas con el gen del factor de crecimiento de fibroblastos como terapia para el dolor neuropático (Kajiyama et al., 2010) (Forouzanfar et al., 2017).

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo son células multipotenciales, capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares, lo que las hace una herramienta potencial para terapia celular, incluida la inserción de genes de interés clínico como parte de una terapia génica *ex vivo*. Por ello, se destaca y resulta primordial el conocer sus características fenotípicas, así como la homogeneidad de dichas características entre distintos pacientes.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo representan una herramienta potencial en el tratamiento de múltiples enfermedades.

Es importante analizar las características morfológicas de las células mesenquimales aisladas a partir de muestras de lipoaspirados, como fuente potencial para la obtención de células madre de interés clínico. El analizar muestras de diferentes pacientes nos permitirá determinar la homogeneidad de dichas características entre las diferentes muestras de lipoaspirados.

## **OBJETIVO GENERAL**

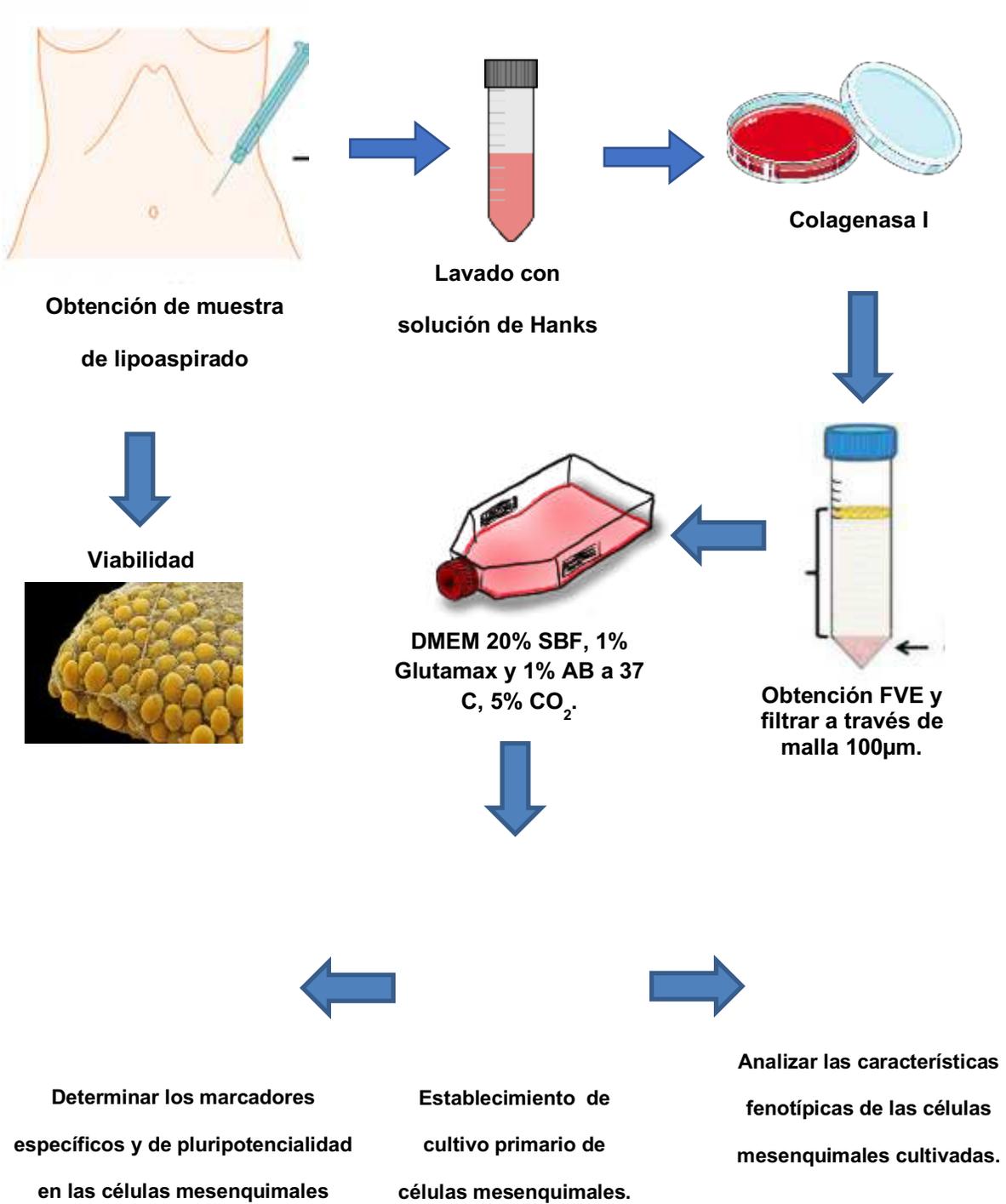
Aislar y caracterizar células mesenquimales obtenidas del tejido adiposo de diferentes pacientes

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer un cultivo primario de células mesenquimales obtenidas de lipoaspirados.
2. Analizar las características fenotípicas de las células mesenquimales cultivadas.
3. Determinar los marcadores específicos y de pluripotencialidad en las células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Estrategia experimental



## **2. Material y Equipo**

### **A. Material de laboratorio**

- Tubos Falcon Corning™ 50 ml y 15 ml
- Cajas Petri Corning™ 60 mm
- Caja de 24 pozos Corning™
- Cubreobjetos Fisher™
- Micropipetas Labnet™
- Hojas de bisturí Hergom®
- Pipetas serológicas de 25 ml, 10 ml y 5 ml Corning™
- Cajas de cultivo celular T25 y T75 Corning™
- Tubos criogénicos Corning™

### **B. Material biológico**

Cultivos primarios de células madre mesenquimales aisladas de lipoaspirados

### **C. Equipo**

- Balanza analítica
- Microscopio de fluorescencia de la marca Nikon Eclipse 50i
- Microscopio invertido Southern Precision Instruments.
- Campana de flujo laminar Labconco
- Incubadora CO2 Thermo Scientific
- Microcentrífuga Spectrafugue 24D de la marca Labnet
- Centrifuga con refrigeración Rotanta 460
- Baño de agua con control de temperatura Revolutionary Science

### **D. Soluciones**

- Paraformaldehído 4% (PFA)
- PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>)
- Solución de Hank Life Technologies Corporation Gibco™
- Cloruro de amonio 160 mM (NH<sub>4</sub>Cl)
- H<sub>2</sub>O ultrapura

## E. Reactivos

- DMEM Alta-glucosa Life Technologies Corporation Gibco™
- Suero Fetal Bovino (SFB) Life Technologies Corporation Gibco™
- L-glutamina 100X Life Technologies Corporation Gibco™
- Solución antibiotica/antimicótica 100x Life Technologies Corporation Gibco™
- 0.25% Tripsina-EDTA Life Technologies Corporation Gibco™
- Colagenasa I Life Technologies Corporation Gibco™
- Dimethylsulfoxide (DMSO) ATCC® 4-X™
- Hematoxilina de Wright Sigma-Aldrich®
- Periodic Acid-Schiff (PAS) Kit Sigma-Aldrich®
- Trichrome Stain (Masson) Kit Sigma-Aldrich®
- Ferricianuro de potasio cristalino Sigma-Aldrich®
- Ferricianuro de potasio trihidratado Sigma-Aldrich®
- Cloruro de magnesio Sigma-Aldrich®
- N,N-Dimethylformamide, for molecular biology, ≥99% Sigma-Aldrich®
- Human KLF4 Antibody Antigen Affinity-purified Polyclonal Goat IgG R&D Systems. Catalog Number: AF3640.
- Human Nanog Antibody Antigen Affinity-purified Polyclonal Goat IgG R&D Systems. Catalog Number: AF1997.
- Human Oct-4A Antibody Monoclonal Mouse IgG R&D Systems. Catalog Number: MAB17591.
- Human LIN-28A Antibody Antigen Affinity-purified Polyclonal Goat IgG. Catalog Number: AF3757.
- Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 555 (ab150082) Abcam (Cambridge, MA, USA)
- DAPI mounting solution (H-1200) Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA).
- Monoclonal anti CD105 US Biologicals, Salem, Massachusetts, USA (dilución 1:25)
- Monoclonal anti CD90 US Biologicals, Salem, Massachusetts, USA (dilución 1:200)

# METODOLOGÍA

## ***1. Aislamiento de células madre mesenquimales de muestras de lipoaspirados***

El tejido adiposo fue obtenido por través de lipoaspiración por el Médico especialista en Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva Dr. Angel Mecott Rivera, quien cuenta con la certificación para realizar el procedimiento; Se utilizó una cánula de 2.5 mm para la obtención del lipoaspirado y se realizó mediante la técnica de tumescencia. Las participantes fueron mujeres (edad entre 20 y 50 años) que asistieron al Departamento de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva del Hospital Universitario perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); las participantes eran pacientes programadas para realizarse una liposucción abdominal manera voluntaria. Se les invitó a participar en el estudio, se les proporcionó información y se obtuvo su consentimiento informado. Se contó con aprobación por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UANL (registro HT19-00001) para la obtención de una muestra del tejido adiposo. Por cada liposucción se colectaron 50 ml de tejido adiposo en tubo Falcon de 50 ml.

En el laboratorio de Genética Molecular se procedió al aislamiento de las MSCs siguiendo un protocolo ya reportado (Bunnell, Flaate, Gagliardi, Patel, & Ripoll, 2008). Primeramente, se hicieron lavados con PBS 1X hasta eliminar la mayor cantidad de eritrocitos. Enseguida se agregó colagenasa I y se incubó a 37 °C con agitación ligera durante 60 minutos. La digestión se considera finalizada cuando el tejido presenta un aspecto viscoso homogéneo. Se inactivó la colagenasa I usando 15 ml de DMEM 20% SBF. El producto de la digestión se filtró por una malla de nylon y fue colectado en un tubo de 50 ml para ser posteriormente centrifugado a 800 g por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en una solución de NH<sub>4</sub>Cl 160 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min para lisar eritrocitos remanentes. Posteriormente, se centrifugó a 400 g por 10 min, el sobrenadante se desechó y el sedimento celular (fracción inferior) se resuspendió en 3 ml de DMEM suplementado con 20% SFB, 1% L-Glutamina y 1% de antibiótico/antimicótico. Se realizó una filtración a través de malla de nylon (100 µm)

para descartar los adipocitos. Enseguida, el filtrado celular se sembró en caja de cultivo T75 con medio DMEM 20% SBF, 1% L-Glutamina y 1% de antibiótico/antimicótico a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Las células se cultivaron por 48 h y después se cambió el medio a DMEM suplementado con 10% SBF, 1% L-Glutamina y 1% de antibiótico/antimicótico recibiendo cambios de medio cada tercer día hasta obtener una confluencia de 90%. Las células aisladas de tejido adiposo se preservaron en DMSO 10% y se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido en fase de vapor después de lograr su cultivo in vitro.

## ***2. Caracterización de células mesenquimales aisladas de tejido adiposo por medio de técnicas histológicas.***

Durante el segundo pasaje, se utilizaron las MSCs aisladas para su caracterización fenotípica. Se realizaron tinciones bajo la técnica de hematoxilina y eosina, Tricrómico de Masson, PAS y Reacción para  $\beta$ -galactosidasa (Descripción de cada técnica en *Anexos*). Previo a realizar la tinción, las células fueron fijadas con PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente y se mantuvieron en PBS 1x hasta el momento de la tinción.

## ***3. Inmunofluorescencia para la detección de integridad celular, marcadores específicos y marcadores de pluripotencialidad de células madre mesenquimales aisladas de tejido adiposo***

Se sembraron 30,000 células/pozo en una caja de cultivo celular de 24 pozos en 1000  $\mu$ l de medio de cultivo DMEM al 10%. Se incubaron y al alcanzar una confluencia del 80%, se removió el medio de cultivo de cada pozo y se realizaron dos lavados con PBS 1x. Se adicionaron 500  $\mu$ l de PFA 4% y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el fijador fue removido y se realizaron 2 lavados con PBS 1x-Tritón X-100 0.1% de 5 minutos cada uno. Se realizó recuperación del antígeno y se adicionó 300  $\mu$ l de suero de caballo al 10% en PBS 1x-Tritón-X-100 0.1 % y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se removió la solución de bloqueo y se adicionó el anticuerpo primario diluido en PBS-1X-Tritón X-100 0.1% - BSA 1% y se dejó incubar toda la noche a 4 °C.

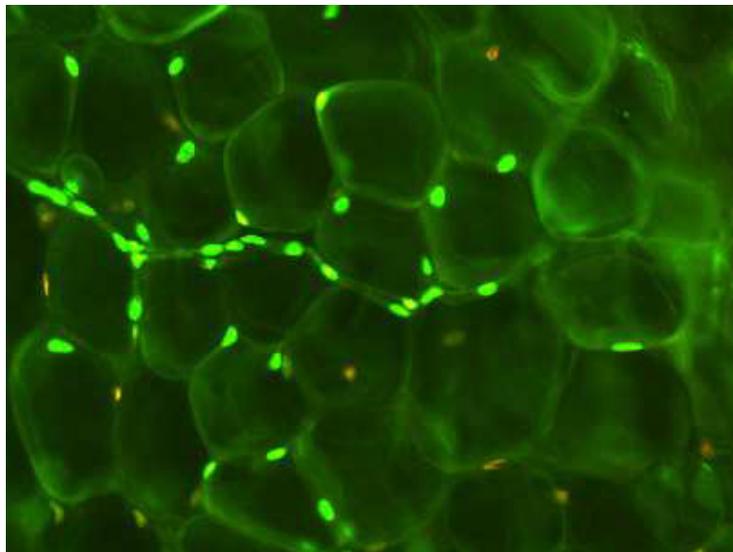
Se recuperó el anticuerpo primario (siendo almacenado a -20 °C) y se realizaron dos lavados con PBS 1x de 5 minutos cada uno protegiendo de la luz. Esto se realizó con cada uno de los anticuerpos utilizados ( $\beta$  actina, Calnexina, Enolasa, CD90, CD105, CD34, KLF4, LIN28, NANOG2, OCT4).

# RESULTADOS

## 1. Establecimiento de cultivos primarios de células mesenquimales a partir de muestra de lipoaspirado

Para obtener una aproximación de la calidad del tejido adiposo recibido, y por ende de las células madre mesenquimales contenidas en él, se decidió evaluar la viabilidad de los lipoaspirados mediante un ensayo con naranja de acridina y bromuro de etidio y se observó en el microscopio de fluorescencia. El naranja de acridina es una molécula liposoluble capaz de entrar a todos los núcleos y emitir una fluorescencia verde, mientras que el bromuro de etidio solamente es capaz de atravesar las membranas dañadas de las células no viables y su fluorescencia se observa en color rojo.

En la figura 3 se muestra el ensayo realizado, lo cual nos indica de forma indirecta el estado de la muestra y un estimado de viabilidad de las MSCs contenidas en el estroma del tejido adiposo el cual fue de un 70-80%.



**Figura 3. Determinación de viabilidad de lipoaspirados.** Ensayo con naranja de acridina/bromuro de etidio. Se observan los núcleos de los adipocitos viables en color verde y, debido al solapamiento de color rojo y verde, en color naranja aquellos adipocitos no viables. Los adipocitos se observan con su morfología característica: forma poliédrica y su núcleo desplazado a la periferia, debido a que la mayor parte de su citoplasma es ocupado por una gota lipídica. Fluorescencia, Aumento 40x.

Una vez aisladas las MSCs mediante la técnica previamente descrita, así como cultivadas bajo las condiciones de igual forma antes descritas, se procedió a observar bajo microscopía de luz las MSCs aún en cultivo (figura 4).

Para poder confirmar el establecimiento del cultivo primario, se tomó en cuenta lo siguiente: Adherencia celular mayor al 90% en un tiempo menor a 24 horas, formación de colonias y morfología.

**Figura. 4 Establecimiento de cultivos primarios de células mesenquimales.** Se observa en las micrografías las características morfológicas de las células mesenquimales *in vitro*: forma ahusada y formación de colonias, así como adherencia a la placa. Microscopía de luz, 40x.

## 2. Características fenotípicas de las células mesenquimales cultivadas

Para analizar la morfología de las MSCs aisladas, se realizó tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E) y se observó bajo un microscopio de luz. En la figura 5, se muestran las características morfológicas típicas de las células mesenquimales, las cuales son distintivas de otros grupos celulares presentes en el estroma del tejido adiposo de donde son aisladas.

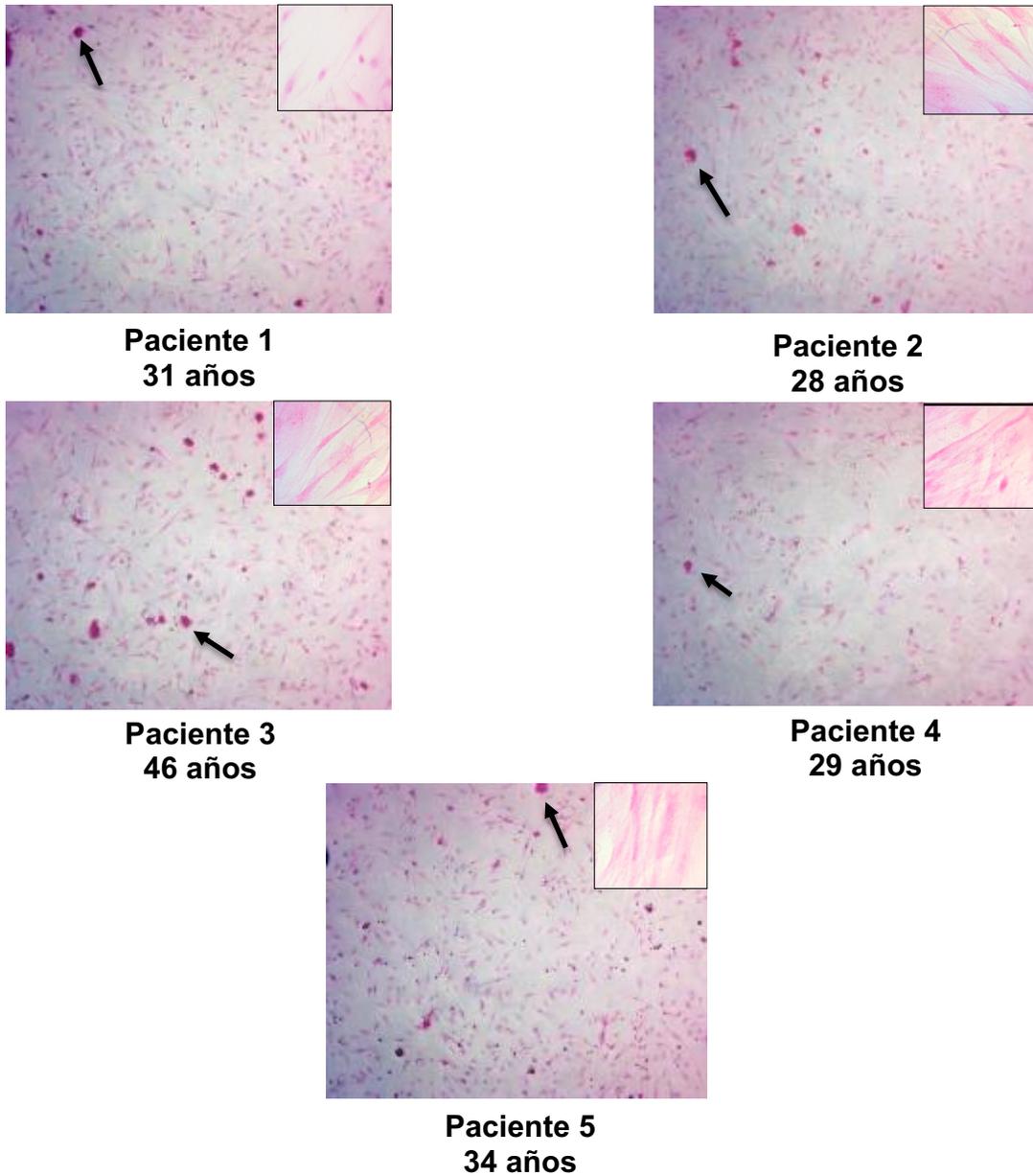
**A**

**B**

**Figura 5. Morfología de células mesenquimales aisladas de lipoaspirados.** Observamos su forma ahusada característica con un núcleo central y ovoide (A), así como la formación de colonias (B). El núcleo se observa en color violáceo debido a la tinción con hematoxilina y el citoplasma en un color rosado debido a su tinción con eosina. Tinción H&E. Microscopía de luz, 40x

Continuando con el análisis morfológico, ahora enfocado a comparar las células cultivadas a partir de los lipoaspirados de las diferentes pacientes, se realizó tinción de H&E a cada una de ellas y se observó bajo el microscopio de campo claro. En la figura 6, se muestra que las muestras de lipoaspirados de diferentes pacientes presentan homogeneidad en la morfología de las células mesenquimales cultivadas.

La técnica de aislamiento de células mesenquimales a partir de lipoaspirados es reproducible y se conservan las características morfológicas de estas células entre las distintas pacientes.

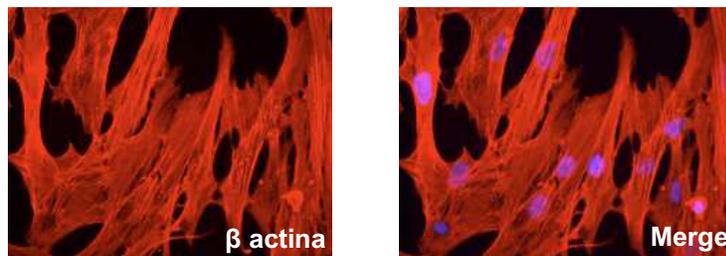


**Figura 6. Análisis morfológico de células mesenquimales de distintas pacientes.** Se presenta un recopilado de micrografías a un aumento de 10x (Paciente 1, 2, 3, 4 y 5) de cada uno de los cultivos establecidos de cada muestra de lipoaspirado de 5 pacientes participantes. Además, se observa la formación de colonias (flechas negras). En el recuadro superior derecho de cada una de las micrografías una imagen a mayor aumento (40x), para mostrar con mayor definición las células mesenquimales aisladas. Tinción H&E, Microscopía de luz, 10x y 40x.

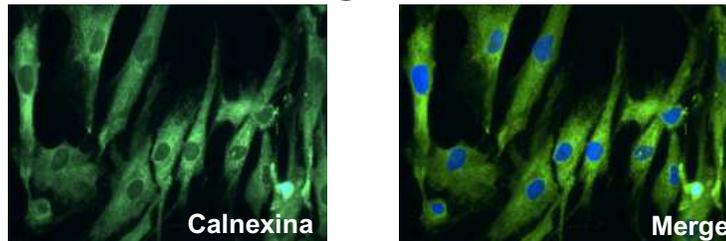
Como parte del análisis morfológico y para evaluar la integridad celular de las células mesenquimales aisladas, se realizó marcaje para  $\beta$  actina, proteína estructural y componente del citoesqueleto; para calnexina, una proteína residente del retículo endoplásmico y para enolasa, enzima metabólica residente en el citoplasma.

En la figura 7 se muestran los resultados del análisis de la integridad celular de las células mesenquimales aisladas. Los análisis de inmunofluorescencia mostraron positividad para  $\beta$  actina en todo el citoplasma, para calnexina la positividad mostró una distribución perinuclear y la distribución para enolasa se observó en el citoplasma. Determinándose que las células mesenquimales obtenidas de lipoaspirados presentan integridad celular.

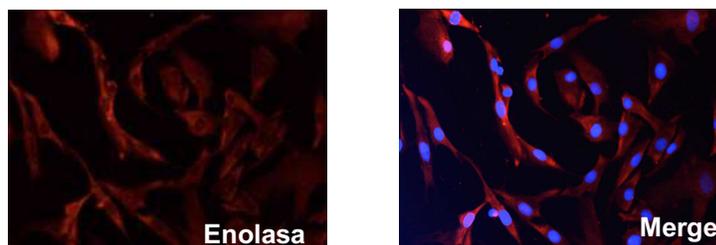
### Citoesqueleto



### Organelos



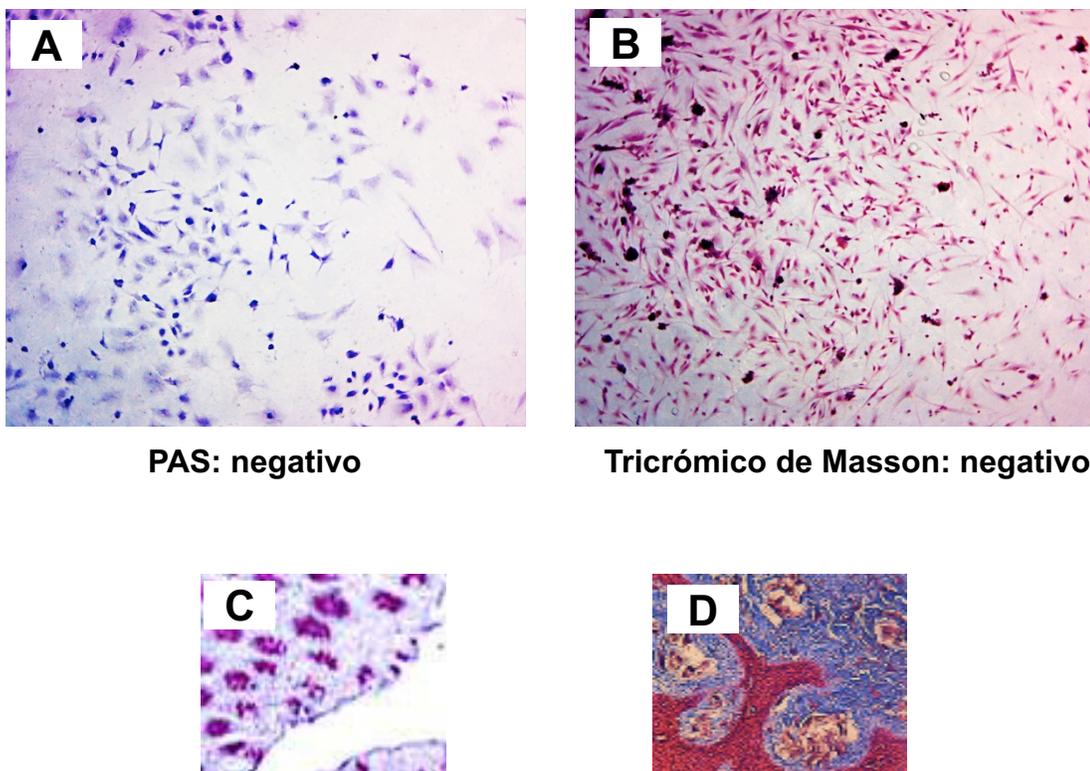
### Enzima metabólica



**Figura 7. Determinación de  $\beta$  actina, calnexina y enolasa.** En la columna de la izquierda se muestra el marcaje para los diferentes componentes celulares y en la columna derecha un merge de las imágenes con DAPI para núcleos. Inmunofluorescencia. Aumento 40x.

Para determinar que las MSCs cultivadas no presentaran secreción de matriz extracelular, tal como ocurre en las células fibroblastoides, se realizaron las tinciones de PAS y tricrómico de Masson y se observó bajo el microscopio de luz.

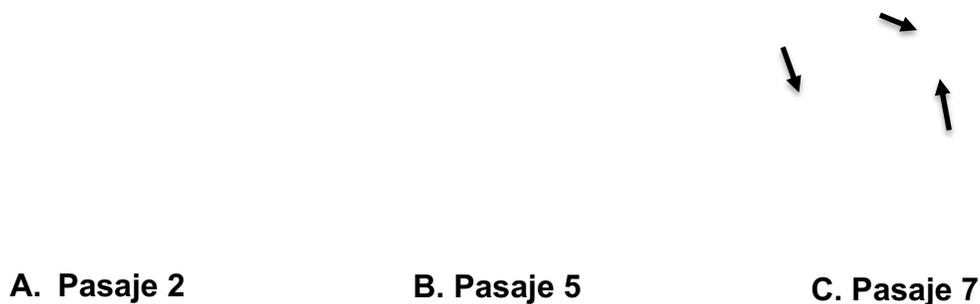
Mediante las técnicas utilizadas, los cultivos de MSCs no mostraron presencia de matriz extracelular. Los controles positivos (C y D) los cuales corresponden a un corte histológico de colon humano (C) y a un corte histológico de piel humana (D), fueron donados por el departamento de histología de la Facultad de Medicina UANL.



**Figura 8. Análisis de la presencia de matriz extracelular.** Cultivos primarios teñidos bajo la técnica de PAS (A) y Tricrómico de Masson (B) donde no se observa presencia de matriz extracelular. En C y D se muestran los controles positivos para ambas técnicas. Microscopía de luz. Aumento 10x.

La senescencia celular es un fenómeno que tradicionalmente se ha caracterizado por la detención de la proliferación de células como respuesta a algún tipo de daño (Rodier & Campisi, 2011). Se sabe que la senescencia celular ocurre como consecuencia del acortamiento de los telómeros después de repetidas divisiones celulares (Cristofalo, Lorenzini, Allen, Torres, & Tresini, 2004).

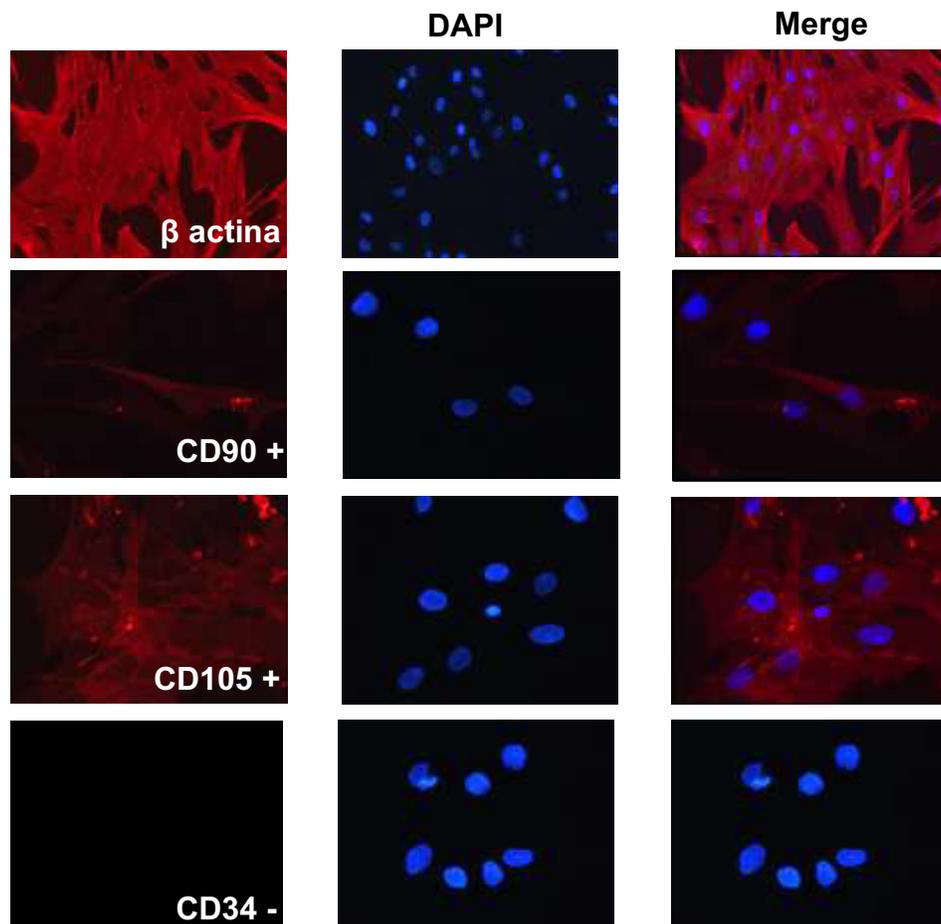
Para determinar el máximo número de pasaje celular previo a la expresión de señales de senescencia en nuestros cultivos primarios de MSCs (característica no deseable en cultivos celulares destinados para terapia celular), procedimos a realizar una reacción colorimétrica con X-gal. En esta técnica, se utiliza el reactivo X-gal como substrato para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual se encuentra en los lisosomas. Y debido a que en las células senescentes hay un aumento de lisosomas acumulados en su interior, la reacción de  $\beta$ -galactosidasa con X-gal libera un compuesto indólico insoluble de color azul que nos permite detectar las células en estado senescente. Por este motivo, se realizó esta reacción en células en pasajes 2, 5 y 7 y se realizó contratinción con violeta de cresilo para mostrar los núcleos. Se puede observar en Figura 9 que es el pasaje 7 quien presenta datos de senescencia celular (pasaje tardío) no observándose en pasajes tempranos.



**Figura 9. Ausencia de senescencia en células mesenquimales cultivadas en pasajes tempranos.** En las micrografías A y B, correspondientes a células en pasajes 2 y 5, no se observa positividad a la reacción y se destaca el núcleo heterocromático el cual forma parte de las características morfológicas de las MSCs. En la micrografía C, se observan las células en pasaje 7 con un franco y fino puntillado de color azul en el citoplasma correspondiente a positividad a la reacción a  $\beta$ -galactosidasa (flechas negras). Aumento 40x.

### 3. Determinación de marcadores específicos y de pluripotencialidad en células mesenquimales aisladas de tejido adiposo

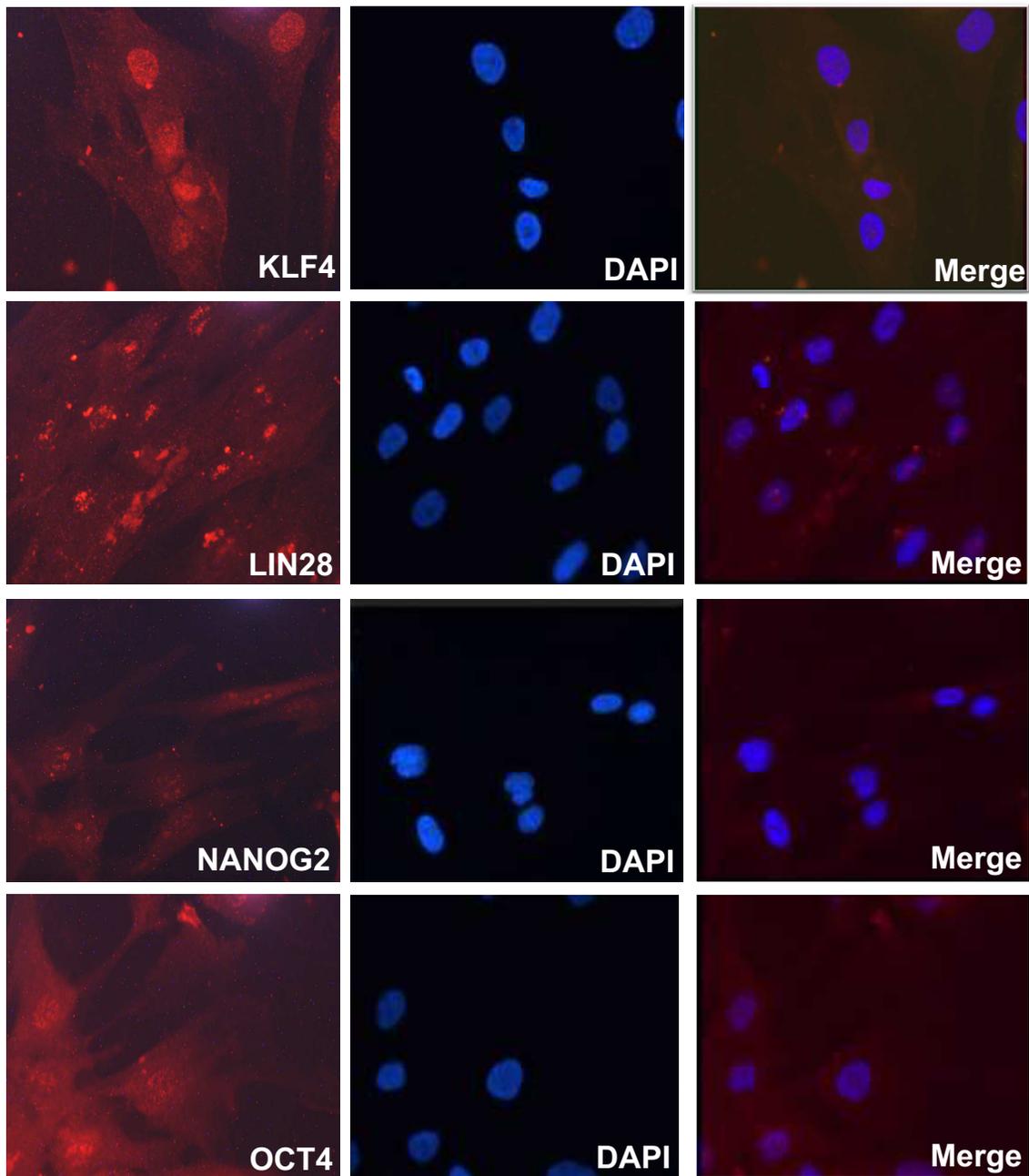
Para poder de determinar la presencia de marcadores específicos de MSCs de tejido adiposo en las células cultivadas, se realizaron análisis de inmunofluorescencia. En la figura 10 se muestra positividad para los marcadores CD90 y CD105 y no se observó marcaje para CD34 ya que es un marcador negativo para MSCs de tejido adiposo, y se encuentra en MSCs de origen hematopoyético.



**Figura 10. Determinación de marcadores específicos de células mesenquimales aisladas de tejido adiposo.** En la primera columna se observa el inmunomarcaje para los distintos marcadores utilizados. Las células mesenquimales cultivadas presentan marcaje positivo para CD90 y CD105 y marcaje negativo para CD34. En la segunda columna se observan los núcleos marcados con DAPI y en la tercera columna se observa un merge del marcador y de DAPI. Inmunofluorescencia. Aumento 40x

Para corroborar que las células MSCs aisladas presentan la expresión de factores asociados a pluripotencialidad, se realizaron análisis de inmunofluorescencia.

En la figura 11 se observan los resultados de los análisis para los marcadores de pluripotencialidad. KLF4 (Krüppel-like factor 4) es un factor de transcripción presente en células pluripotenciales embrionarias y mostró marcaje positivo. Otro de los marcadores que mostró positividad fue LIN28, presente también en células pluripotenciales embrionarias e implicado en múltiples funciones, como la capacidad de diferenciación a otros linajes celulares. NANOG2, otro factor de transcripción presente también en ESC, mostró marcaje positivo. Por último, las células mesenquimales cultivadas mostraron marcaje para OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4 ) otro factor de transcripción presente en células embrionarias.



**Figura 11. Determinación de marcadores de pluripotencialidad.** En la primera columna se observa el inmunomarcaje para los distintos marcadores utilizados. Las células mesenquimales cultivadas presentan marcaje positivo para KLF4 (núcleo), LIN28 (núcleo y citoplasma), NANOG2 (núcleo) y OCT4 (núcleo). En la segunda columna se observan los núcleos marcados con DAPI y en la tercera columna se observa un merge del marcador y de DAPI.

## DISCUSIÓN

Las MSCs se han convertido en el grupo celular con mayor potencial terapéutico en la medicina. La aplicación clínica de estas células es aplicable a todos los grupos. En este trabajo, se analizaron las características fenotípicas de células mesenquimales aisladas de diferentes muestras de lipoaspirados de pacientes con diferentes edades.

La importancia del análisis morfológico de estas células radica principalmente por su potencial terapéutico, no sólo por su estado indiferenciado, sino como células que pueden ser sometidas a edición génica (Filho et al., 2019) para una futura terapia génica *ex vivo*.

En cuanto a los resultados mostrados en este trabajo, describimos la morfología de MSCs de 5 pacientes de diferente edad. Realizamos un análisis morfológico mediante diferentes técnicas histológicas evidenciando así las principales características de las MSCs aisladas de tejido adiposo. Observamos su forma celular ahusada y características *in vitro* como la formación de colonias y adherencia a la placa (Cao, Liu, Xu, Xu, & Feng, 2015), así como la ausencia de matriz extracelular que observamos mediante las tinciones de PAS y Tricrómico de Masson. Todos los cultivos de MSCs establecidos mostraron las mismas características morfológicas aún y cuando las pacientes eran de edades diferentes. Se ha reportado que la cantidad de MSCs obtenidas a partir de tejido adiposo depende de la edad del individuo, es decir, a mayor edad, se obtiene una menor cantidad de MSCs (Liu et al., 2017), sin embargo estos resultados fueron de una población diferente a la mexicana así como una menor muestra de tejido graso; la técnica utilizada por dicho grupo de trabajo fue muy similar a la utilizada por nosotros, variando en el número de lavados realizados, la solución utilizada (PBS 1x) así como el número de rpm (1000) en el paso final de centrifugación. En relación a las características fenotípicas, nuestras observaciones son muy similares a numerosos reportes, aún y cuando estos reportes se han realizado en diversas poblaciones mundiales.

La actividad de  $\beta$ -galactosidasa es el método más utilizado para la identificación de células en estado senescente. Nosotros observamos detección de esta enzima en el pasaje 7 de las células aisladas, no mostrándose así en pasajes tempranos (pasajes 2 y 5); así mismo han reportado también la detección de  $\beta$ -galactosidasa a partir del pasaje 5 o incluso hasta el pasaje 11 mediante esta misma técnica (Liu et al., 2017) (Gu et al., 2016). Esta disparidad en el número de pasaje donde se observó el fenómeno de senescencia entre previos trabajos y nuestros resultados, quizás pudiera deberse a diversos factores externos que pudieran estar influenciando la calidad de las MSCs. Debemos tener en cuenta que la senescencia celular es inducida por factores intrínsecos y extrínsecos (Courtois-Cox, Jones, & Chichowski, 2008)(Chakkalakal, Jones, Basson, & Brack, 2012) como estrés oxidativo, mutaciones en el ADN mitocondrial, exposición a radiación ultravioleta (UV), por solo mencionar algunos. Conforme se realizan pasajes a las células cultivadas, la senescencia celular puede desencadenarse por agotamiento replicativo, daño en el ADN y acortamiento de los telómeros (Chakkalakal et al., 2012). Por otro lado, es importante mencionar que en este trabajo solo se muestran resultados de 5 participantes con diferente edad, quizás para darle solidez a nuestros resultados, se debería incrementar el número de participantes para cada edad.

La caracterización mediante clusters de diferenciación (CD) a las MSCs, ha significado todo un reto para los investigadores. Ya que, aún y cuando se aíslan de la misma fuente, las células pueden presentar distintos marcadores a lo largo de los pasajes; sin embargo, se han establecido marcadores para poder confirmar el origen celular y determinar el estado de diferenciación de las células aisladas (Mushahary, Spittler, Kasper, Weber, & Charwat, 2018). Nuestros resultados demuestran que las células que se aislaron de las diferentes muestras de lipoaspirados, presentan un marcaje positivo para CD105 y CD90, siendo estos marcadores específicos de MSCs de tejido adiposo (Mushahary et al., 2018) (Gimble, Katz, & Bunnell, 2007) (Im, 2017) (Cao et al., 2015) además, mostraron un marcaje negativo para CD34, el cual es un marcador específico de MSCs de origen hematopoyético.

Determinar la presencia de marcadores de pluripotencialidad en MSCs, ya sea de tejido adiposo o de otras fuentes, ha proporcionado un mayor conocimiento sobre las bases moleculares de la diferenciación de estas células hacia distintos linajes. Se ha reportado que los depósitos de tejido adiposo de individuos obesos ya han comprometido todas sus reservas de MSCs para diferenciarse al linaje adipogénico, y por lo tanto, disminuyen su capacidad para generar nuevos adipocitos (Danforth, 2000)(Cedeberg & Enerback, 2003). En nuestros resultados mostramos que las MSCs aisladas presentaron marcaje positivo para los factores de pluripotencialidad KLF4, LIN28, NANOG2 y OCT4.

Se ha reportado que a mayor expresión de KLF4 mayor es la capacidad de la célula mesenquimal para su diferenciación a un linaje celular de músculo liso (Aji et al., 2017). Por otra parte, se ha observado una disminución en la expresión de LIN28 en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo cuando hay una alteración de la función de la glucosa (Pérez et al., 2013). Nanog2, otro de los factores de transcripción expresado en las MSCs aisladas, se ha reportado como un regulador de la capacidad de diferenciación en MSCs, (Langroudi, Forouzandeh, Soleimani, Atashi, & Golestaneh, 2013) (Lengner et al., 2007) recalcando que la mayoría de lo reportado se ha realizado en MSCs de origen hematopoyético y no en tejido adiposo (Pitrone et al., 2019). Se ha reportado que la expresión de NANOG disminuye la capacidad de proliferación celular e induce la detención del ciclo celular en MSCs derivadas de tejido adiposo. Por otro lado, una menor expresión de OCT4 en MSCs derivadas de tejido adiposo, se ha asociado con una menor capacidad de diferenciación a un linaje osteogénico.

En este trabajo se logró evaluar las características morfológicas de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo aisladas de diferentes pacientes. Estas características nos permiten observar una viabilidad estable de estas MSCs. De acuerdo a estos resultados, las MSCs obtenidas podrían ser utilizadas para terapia celular.

## **CONCLUSIONES**

- Los cultivos obtenidos de muestras de diferentes pacientes mostraron las características fenotípicas propias de cultivos de células madre mesenquimales no hematopoyéticas.
- La caracterización fenotípica realizada de los cultivos de células madre mesenquimales demuestra que existe homogeneidad entre las diferentes muestras de lipoaspirados de distintas pacientes con diferente edad.

## **APORTACIONES Y PERSPECTIVAS**

- Los cultivos de células madre mesenquimales establecidos a partir de los lipoaspirados, representan una fuente valiosa como herramienta terapéutica para diversas enfermedades.
- Estos resultados son importantes para estudios posteriores en el campo de terapia celular y terapia génica.

# ANEXOS

## Tinción H-E

1. Realizar lavado con agua destilada de forma breve.
2. Colocar cubreobjetos en Hematoxilina de Gill por 2 min.
3. Lavar con agua de la llave de forma lenta; realizar dos lavados.
4. Sumergir de forma rápida en Alcohol Ácido.
5. Lavar con agua de la llave de forma lenta; realizar dos lavados.
6. Colocar cubreobjetos en Agua amoniaca de forma rápida 2 veces (2 inmersiones rápidas).
7. Lavar con agua de la llave de forma lenta; realizar dos lavados.
8. Enjuagar con agua destilada de forma breve.
9. Sumergir los cubreobjetos 6 veces de forma rápida en Eosina.
9. Aclarar con alcohol etílico 70° de forma breve.
10. Aclarar en alcohol etílico 96° de forma breve.
10. Aclarar en etanol absoluto (100°) de forma rápida.
11. Aclarar en Etanol-Xilol por 1 minuto.
12. Colocar en Xilol por 30 seg.
14. Realizar montaje con resina sintética o Entellan

Para la preparación se debe seguir el orden, en agitación, a temperatura ambiente por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

Eosina

### Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 grs.
Agua destilada	20 mL
Alcohol del 96°	80 mL

*Solución de trabajo:*

Tomar una parte de la solución stock y agregarla en tres partes de alcohol de 80°C. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

*Solución de Alcohol-Ácido (Diferenciador o decolorante).*

Alcohol de 70°                      99 ml

Ácido Clorhídrico (HCl)    1 ml

*Solución de Agua Amoniacal (Virador).*

Agua destilada                    99 ml

Hidróxido de Amonio        1 ml

### **Tinción Violeta de Cresilo**

1. Realizar 2 lavados con agua destilada de 2 minutos cada uno.
2. Aplicar la solución de violeta de cresilo a los cubreobjetos por 20 min en un horno a 45°C.
3. Realizar enjuague en agua destilada.
4. Realizar deshidratar en alcoholes de 100°, 96° y 70° por 30 seg c/u.
8. Aclarar con 2 cambios de xilol de 5 min c/u.
5. Realizar montaje con resina.

Preparación de soluciones

*Violeta de cresilo 0.5%*

Violeta rápido de cresilo                      0.5 grs de

Agua destilada                                      100 ml

*Solución diferenciadora 0.025 %*

Acido acético glacial                            250 µl

Alcohol etílico absoluto                        100 ml

## Tricrómico de Masson

1. Usar como “mordente” el fijador de Bouin por 30-60 min a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente.
2. Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
3. Enjuagar los cortes en agua destilada.
4. Teñir con hematoxilina Férrica de Weigert durante 10 min.
5. Lavar en agua corriente 5 min o hacer 3 cambios de 15 segundos
6. Enjuagar en agua destilada.
7. Teñir con la solución de Fucsina-Escarlata por 5 segundos (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
8. Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
9. Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
10. Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 segundos (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
11. Lavar con agua destilada varias veces hasta eliminar el exceso del colorante.
12. Pasar al acético acuoso por 1-2 min.
13. Deshidratación gradual en alcoholes por unos segundos (cuidar que no se decolore).
15. Continuar con el alcohol absoluto hasta acarar en xilol y montar en resina.

### Preparación de soluciones

#### *Hematoxilina férrica de Weigert*

##### Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1 gr.
Alcohol de 96°	100 ml

##### Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 ml
Agua destilada	95 ml
Ácido clorhídrico concentrado	1 ml

*Solución de trabajo:*

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y de consistencia, con el tiempo suele precipitarse).

*Solución acuosa de Cloruro Férrico*

Cloruro férrico 14.5 gr.

Agua destilada 50 ml

*Solución acuosa de escarlata de Biebrich*

Escarlata de Biebrich 1 gr

Agua destilada 100 ml

*Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico*

Ácido Fosfomolibdico 5 gr

Ácido Fosfotúngstico 5 gr.

Agua destilada 200 ml

*Solución acuosa de ácido acético al 1%*

Ácido acético glacial 1 ml

Agua destilada 99 ml

*Solución de azul de anilina*

Azul de anilina 2.5 gr

Agua destilada 100 m

Ácido acético glacial 2 ml

*Solución fijadora de Bouin*

Solución acuosa saturada de ácido pícrico 75 m

Formaldehído (36-38 %) 25 ml

Ácido acético glacial 5 ml

## PAS

1. Colorar la solución del ácido periódico de 5-10 minutos.
2. Enjuagar los cortes en agua destilada.
3. Colocar el reactivo de Schiff, dejar incubando por 20 minutos; se debe revisar que el tejido adquiera un color rosa pálido.
4. Diferenciar los cortes en la solución de enjuague sulfurosa dando 2 cambios de 2 minutos.
5. Enjuagar los cortes en agua destilada.
6. Contrastar con hematoxilina de Gill por 1 a 2 minutos.
7. Lavar los cortes en agua corriente.
8. Decolorar los cortes en alcohol-ácido, cuidando de no desteñir demasiado, y lavar en agua corriente.
9. Virar con agua amoniacal, lavar en agua corriente y enjuagar con agua destilada.
10. Deshidratar en alcoholes graduales hasta alcohol absoluto.
11. Aclarar en xilol y montar con resina.

### Preparación de soluciones

#### *Solución acuosa de ácido periódico 0.5%*

Ácido periódico (cristales)	0.5 g
Agua destilada	100 ml

#### *Solución de enjuague sulfurosa*

Agua destilada	300 ml
Ácido clorhídrico 1N	15 ml
Metabisulfito de sodio 10%	18 ml

#### *Solución de Metabisulfito de sodio 10%*

Metabisulfito de sodio 10%	10 g
Agua destilada	100 ml

#### *Solución de ácido clorhídrico 1 N*

Ácido clorhídrico	8.35 ml
Agua destilada	91.65 ml

## Reacción para $\beta$ -galactosidasa

1. Realizar 3 lavados con 3 cambios de PBS durante de 5 minutos cada uno y luego enjuagar con agua destilada.
2. Añadir la solución de trabajo X-gal a 37 ° C durante 24 horas (se utiliza una cámara humidificada para evitar que los cubreobjetos se sequen).
3. Enjuagar en PBS 1x 2 veces por 5 minutos cada enjuague
4. Enjuague con agua destilada brevemente.
5. Realizar contratinción con rojo rápido durante 5 minutos.
6. Enjuagar en agua destilada.
7. Montar con medio de montaje acuoso.

### *Buffer de dilución X-gal*

Ferricianuro de potasio cristalino (5 mM)	160 mg
Ferricianuro de potasio trihidrato (5 mM)	210 mg
Cloruro de magnesio (2 mM)	20 mg
PBS 1x	100 ml

Mezclar bien y almacenar a 4 °C, protegido de la luz. Calentar a 37°C antes de usar.

### *Solución madre X-gal (4% en DMF):*

X-gal	20 mg
DMF (N, N Dimetilformamida)	0.5 ml

Mezclar hasta que esté completamente disuelto. Almacenar a -20 °C, protegido de la luz.

### *Solución de trabajo X-gal:*

Primero calentar el tampón de dilución X-gal a 37 °C para evitar la precipitación de X-gal. Posteriormente, diluir la solución madre de X-gal 1:40 en el buffer de dilución X-gal caliente (mantener el buffer a 37 ° C antes de aplicar).

## BIBLIOGRAFÍA

- Aji, K., Zhang, Y., Aimaiti, A., Wang, Y., Rexiati, M., Azhati, B., ... Wang, C. (2017). MicroRNA-145 regulates the differentiation of human adipose-derived stem cells to smooth muscle cells via targeting Krüppel-like factor 4. *Molecular Medicine Reports*, 15(6), 3787–3795. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6478>
- Allay, J., Dennis, J., Haynesworth, S., Majumdar, M., Clapp, D., & Shultz, L. (1997). LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther*, 8, 1417–1427.
- Anderson, W. (1992). Human gene therapy. *Science*, 256(808–813).
- Aquino, J. B., Bolontrade, M. F., García, M. G., Podhajcer, O. L., & Mazzolini, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Therapy*, 17(6), 692–708. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.10>
- Auger, F., Berthod, F., Moulin, V., Pouliot, R., & Germain, L. (2004). Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnol Appl Biochem*, 39(263).
- Baksh, D. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Cell Mol Med*, 8(3), 301–316.
- Bielke, C., & Erbacher, A. (2010). *Nucleic Acid Transfection*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bloom, R., Goldberg, L., Wang, A., TW, F., & Kotloff, R. (2005). An overview of solid organ transplantation. *Clin Chest Med*, 26(4), 529–543.
- Bourin, P., Bunnell, B., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A., March, K., ... Gimble, J. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. *Cytotherapy*, 15.
- Bunnell, B., Flaatt, M., Gagliardi, C., Patel, B., & Ripoll, C. (2008). Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation. *2Methods*, 45(2), 115–120.
- Cao, F., Liu, T., Xu, Y., Xu, D., & Feng, S. (2015). Culture and properties of adipose-derived mesenchymal stem cells: Characteristics in vitro and immunosuppression in vivo. *International Journal of Clinical and Experimental*

*Pathology*, 8(7), 7694–7709.

- Cardoso, T., Ferrari, H., & Garcia, A. (2012). Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol*, 4(12).
- Cedeberg, A., & Enerback, S. (2003). Insulin resistance and type 2 diabetes—an adipocentric view. *Curr Mol Med*, 3.
- Chakkalakal, J., Jones, K., Basson, M., & Brack, A. (2012). The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature*, 490(7420).
- Chen, J., Mou, X., & Du, X. (2015). Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pac J Trop Med*, 8(9), 739–746.
- Chen, Y., Whetstone, H., Lin, A., Nadesan, P., Wei, Q., & Poon, R. (2007). Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med*.
- Courtois-Cox, S., Jones, S., & Chichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 27(20).
- Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., & Tresini, M. (2004). Replicative senescence: A critical review. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10-11 SPEC. ISS.), 827–848.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.010>
- Danforth, E. (2000). Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nature Genetics*, 26(13).
- De Luca, M., Pellegrini, G., & Green, H. (2006). Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts. *Regen Med*, 1(45).
- DeFrancesco, L. (2012). Adult stem cell therapies walk the line. *Nature Biotechnology*, 30(8), 739–741.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy Position Statement. Cytotherapy*, 8, 315–317.
- Doran, P. (2015). Cartilage Tissue Engineering: Methods and Protocols. In *Methods in Molecular Biology*.
- Filho, D. M., Ribeiro, P. D. C., Oliveira, L. F., Luiza, A., Terra, R., Parreira, R. C., ... Resende, R. R. (2019). Enhancing the Therapeutic Potential of

## Mesenchymal Stem Cells with the CRISPR-Cas System.

- Forouzanfar, F., Amin, B., Ghorbani, A., Ghazabi, H., Ghasemi, F., Sadri, K., ... Sadeghnia, H. (2017). New approach for the treatment of neuropathic pain: Fibroblast growth factor 1 gene-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells. *European Journal of Pain*, 22(2), 295–310.
- Gimble, J., Katz, A., & Bunnell, B. (2007). Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res*, 100(9).
- Gnecchi, M., & Melo, L. (2009). Bone Marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction and production of conditioned medium. In *Stem cells in regenerative medicine. Methods in molecular biology* (pp. 281–294).
- Gonzalez Lopez, J. (2009). La terapia celular en la practica medica. *Rev Sanid Milit Mex*, 63(2), 74–83.
- Gu, Y., Li, T., Ding, Y., Sun, L., Tu, T., Zhu, W., ... Sun, X. (2016). Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 13, 5207–5215.
- Haleem-Smith, H., Derfoul, A., & Okafor, C. (2005). Optimization of high-efficiency transfection of adult mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Biotechnol*, 30(9).
- Hauben, D., Baruchin, A., & Mahler, A. (1982). On the history of the free skin graft. *Ann Plast Surg*, 9(3), 242–5.
- Im, G. (2017). Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal cells: Their comparative efficacies and synergistic effects. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH*, 105(9).
- Kajiyama, H., Hamazaki, T. S., Tokuhara, M., Masui, S., Okabayashi, K., Ohnuma, K., ... Asashima, M. (2010). Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(4), 699–705. <https://doi.org/10.1387/ijdb.092953hk>
- Lamme, E., Van Leeuwen, R., Brandsma, K., Van Marie, J., & Middelkoop, E. (2000). Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol*, 190(595).
- Langroudi, L., Forouzandeh, M., Soleimani, M., Atashi, A., & Golestaneh, A. (2013). Induction of differentiation by down regulation of Nanog and Rex-1 in cord blood derived unrestricted somatic stem cells. *Mol. Biol. Rep*, 20.
- Lee, D., Park, S., & Kim, E. (2004). Enhancement of re-closure capacity by the

- intra-amniotic injection of human embryonic stem cells in surgically induced spinal open neural tube defects in chick embryos. *Neurosci Lett*, 364, 98–100.
- Lengner, C., Camargo, F., Hochedlinger, K., Welstead, G., Zaidi, S., Gokhale, S., ... Jaenisch, R. (2007). Oct4 Expression Is Not Required for Mouse Somatic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*, 1.
- Liu, M., Lei, H., Dong, P., Fu, X., Yang, Z., Yang, Y., ... Xiao, R. (2017). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties. *Cell Transplantation*, 26(9), 1505–1519.  
<https://doi.org/10.1177/0963689717721221>
- Madeira, C., Mendes, R., Ribeiro, S., Boura, J., Aires-Barros, M., Da Silva, C., & Cabral, J. (2010). Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy. *J Biomed Biotechnol*, 2010.
- Malik, N. N., & Durdy, M. B. (2014). Cell Therapy Landscape. *Translational Regenerative Medicine*, (December 2015), 87–106.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410396-2.00007-4>
- Matar, P., Alaniz, L., Rozados, V., Aquino, J., Malvicini, M., & Atorrasagasti, C. (2009). Immunotherapy for liver tumors: present status and future prospects. *J Biomed Sci*, 16(30).
- Matthews, K., & Keating, A. (1996). Gene therapy with physical methods of gene transfer. *Transfus Sci*, 17, 29–34.
- McGovern, J., Russel, P., Atkins, L., & Webster, E. (1959). Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N Engl J Med*, 260, 675–683.
- Mohammadian, M. Abasi, E. Akbarzadeh, A. (2015). Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(5), 1206–1211.  
<https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1029624>
- Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
- Nagamura-Inoue, T., & He, H. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells*, 6(2), 95–202.
- Noth, U., Osyczka, A., Tuli, R., Hickok, N., Danielson, K., & Tuan, R. (2002). Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-

- derived cells. *J. Orthop Res.*, 20, 1060–1069.
- Pérez, L. M., Bernal, A., San Martín, N., Lorenzo, M., Fernández-Veledo, S., & Gálvez, B. G. (2013). Metabolic rescue of obese adipose-derived stem cells by lin28/let7 pathway. *Diabetes*, 62(7), 2368–2379. <https://doi.org/10.2337/db12-1220>
- Pitrone, M., Pizzolanti, G., Coppola, A., Tomasello, L., Martorana, S., Pantuso, G., & Giordano, C. (2019). Knockdown of NANOG Reduces Cell Proliferation and Induces G0 / G1 Cell Cycle Arrest in Human Adipose Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2580), 2–13.
- Polchow, B., Kebbel, K., & Schmiedeknecht, G. (2012). Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. *J. Transl Med*, 16(10).
- Prockop, D. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71–74.
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 547–556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Sandoval-Rodríguez, A., Meza-Ríos, A., García-Bañuelos, J., & Armendáriz-Borunda, J. (2016). CAPÍTULO 30: Células madre y su aplicación en la terapia celular. In *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*.
- Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M., & Davies, J. (2004). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*.
- Schipper, B., Marra, K., & Rubin, J. (2006). Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. In *Fourth Annual International Fat Applied Technology Society*.
- Singh, A., Singh, A., & Sen, D. (2016). Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015). *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0341-0>
- Singh, R. (2014). Chapter 2: Stem Cells: The Holy Grail of Regenerative Medicine. In *Engineering in Translational Medicine*.
- Strem, B., Hicok, K., & Zhu, M. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue- derived stem cells. *Keio J Med*, 54, 132–141.
- Syed, B., & Evans, J. (2013). Stem cell therapy market. *Nat Rev Drug Discov*, 12(3), 185–186.

- Tandon, P, Wafer, R., & Minchin, J. (2018). Adipose morphology and metabolic disease. *The Journal of Experimental Biology*, 221(1).
- Tandon, Panna, Wafer, R., & Minchin, J. E. N. (2018). Adipose morphology and metabolic disease. *The Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl 1), jeb164970. <https://doi.org/10.1242/jeb.164970>
- Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., & Shapiro, S. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147.
- Trottier, V., Marceau-Fortier, G., Germain, L., Vincent, C., & Fradette, J. (2008). IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells*, 26.
- Trounson, A., Thakar, R., Lomax, G., & Gibbons, D. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med*, 9(52).
- Ullah, I., Subbarao, R., & Gyu, J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*, 35(2).
- Unzué, J. (2006). El trasplante en Navarra y España. *An. Sist. Sanit. Navar*, 29(2), 7–14.
- Van Harmelen, V., Rohrig, K., & Hauner, H. (2004). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*, 53, 632–637.
- Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*, 327(3), 449–462.
- Zuk, P., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D., Huang, J., Mizuno, H., ... Hedrick, M. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13, 4279–4295.