





**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**Facultad de Farmacia**

**Universidad de Sevilla**

**TESIS DOCTORAL**



**Estudio de la viabilidad y diferenciación de las células madre mesenquimales de tejido adiposo en condiciones de estrés oxidativo y envejecimiento. Posibilidad de su uso terapéutico e influencia del factor de elongación 2**







**Dr. Antonio Ayala Gómez**, Catedrático de Universidad asociado a la Universidad de Sevilla, **Dra. Remedios Guillén Sans**, Profesora Titular de Universidad asociada a la Universidad de Sevilla, y **Dr. Matías Guzmán Chozas**, Profesor Titular de Universidad asociado a la Universidad de Sevilla,

**INFORMAN:**

Que **D. Mario Faustino Muñoz Pinto** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral titulada **Estudio de la viabilidad y diferenciación de las células madre mesenquimales de tejido adiposo en condiciones de estrés oxidativo y envejecimiento. Posibilidad de su uso terapéutico e influencia del factor de elongación 2**. Considerando que constituye trabajo de tesis doctoral, autorizamos su presentación para optar al título de Doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Sevilla a 14 de Enero de 2016.

**Fdo. Antonio Ayala Gómez    Fdo. Remedios Guillén Sans    Fdo. Matías Guzmán Chozas**





**Dr. Juan D. Bautista Palomas**, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla,

**INFORMAN:**

Que **D. Mario Faustino Muñoz Pinto** ha realizado el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral bajo la dirección del **Dr. Antonio Ayala Gómez**, de la **Dra. Remedios Guillén Sans** y del **Dr. Matías Guzmán Chozas**.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Sevilla a 14 de Enero de 2016.

**Fdo. Dr. Juan D. Bautista Palomas**



*“Envejecer es todavía el único  
medio que se ha encontrado para  
vivir más tiempo.”*



---

**AGRADECIMIENTOS**

---



La inspiración nunca llega cuando con urgencia se le necesita, y son muchas personas a las que me gustaría agradecer la finalización de este trabajo con unas palabras endulzadas de agradecimiento. Palabras que serán inefables por toda la gratitud que siento hacia ellas, y que probablemente en este limitado espacio no quepan todas ellas. La inspiración existe pero tiene que encontrarte trabajando, así que comenzaré sin más preámbulos esta larga lista de agradecimientos y que la inspiración me pille por sorpresa.

La primera persona a la que tengo que agradecer este trabajo es a **Antonio Ayala**, pues él ha sido el artífice, el arquitecto y el fundador de esta aventura, y quien me dio la oportunidad única de capitanearla hasta su conclusión. Comportándose como un verdadero padre, por sus enseñanzas y buenos consejos tanto en lo profesional como en lo sentimental. Estando a mi lado no solo en los malos momentos, sino también los buenos, los cuales me enorgullece decir que han sido muchos y que espero que sean más. Solo por haber conocido a una magnífica persona como él, esta aventura ha merecido la pena. Por ello, siempre le estaré eternamente agradecido.

No menos importantes son mis otros dos directores, **Remedios Guillén** y **Matías Guzmán**. Los considero parte de mi familia, pues con ellos no solo nos han unido exclusivamente vínculos laborales, sino también vínculos afectivos. Con ellos he compartido momentos de alegría y tristeza, he vivido largas horas con sus historias, sus familias y sus pensamientos. En sus senos familiares me he involucrado, compartiendo experiencias y emociones. Y todo ello hace que este trabajo, profesional ante todo, tenga sus propios sentimientos, pues las experiencias incluidas en ellas no solo sean laborales, sino también sentimentales. Por ello una vez más, y nunca me cansaré de decirlo: GRACIAS.

Si hay una persona que institucionalmente su valía no ha sido reconocida lo suficientemente en este trabajo, es **Mercedes Cano**, pues considero que su implicación y dedicación en este proyecto ha sido gratificante y con tanto esfuerzo como cualquiera de mis otros directores. Es para mí por tanto la cuarta directora de este proyecto. Con ella he vivido y compartido momentos de alegría y tristeza, he compartido experiencias y emociones y me ha aceptado como parte de su familia.

También, tengo que agradecer enormemente a dos personas que me han dedicado su preciado tiempo en enseñarme la mayor parte del conocimiento y aptitudes que un investigador debe tener para poder llevar a cabo este trabajo. **Sandro Argüelles**, te agradezco y estaré en deuda contigo por haberme enseñado no solo la electroforesis, los western, el

FOX... y muchísimas técnicas más que robaron tu tiempo para enseñarme, sino también por enseñarme a pensar como investigador, hablar con los comerciales, a pedir ayuda y en definitiva a ser mejor persona. Muy a mi pesar no he tenido el tiempo suficiente para aprender más de tus conocimientos, y que esta distancia que nos separa, aunque siempre estás ahí cuando lo necesito, no se prolongue por más tiempo y pueda continuar aprendiendo de ti. **Manuel Sarmiento**, fuiste la primera persona a la que encargaron enseñar a un pobre y verde alumno interno, y con tu paciencia y sabiduría me enseñaste a ser el mejor manipulador de animales, hacer inmunes, a perfundir, a cortar cerebros... Y tal como tú me enseñaste, intento humildemente transmitir todos aquellos consejos que me dabas. Siento la misma pena que con Sandro, no tenerte el suficiente tiempo a mi lado para haber aprendido más de tus conocimientos. Pero también me enseñaste a que yo mismo tengo que ser quien sea la fuente de conocimiento. Todavía me acuerdo cuando te hizo gracia que anotase en mi cuaderno mi primer experimento como EXP 001, con previsiones de llegar algún día al EXP 999.

Esta Tesis hubiera sido más costosa seguramente si no hubiera contado con la indiscutible y altruista ayuda de **Antonio José Herrera**, **Martiniano Santiago** y **José Luis Venero**. Para mí los tres grandes sabios del departamento, que no solo se han portado como verdaderos mentores, aconsejándome sobre temas tan diversos como la estadística o la neurociencia, sino también hemos compartido buenos momentos sobre nuestras aficiones seriéfilas, políticas y deportivas con las que muchas veces hemos amenizado las largas e interminables tardes de trabajo. Son para mí, verdaderos ejemplos de buenos investigadores cuyos pasos seguir. También, en el sector femenino existen grandes investigadoras que me han infundido sus valores y profesionalidad, y en las que algún día me gustaría verme reflejado. Son **Rocío Martínez** y **Ana María Espinosa**. No solo agradezco todo lo que me hayan podido enseñar sino también la oportunidad de colaborar con ellas, que siempre ha sido, es y será un placer y un orgullo, no solo por lo profesionales que son, sino también por la alegría y simpatía que desborban, y el optimismo cuando a veces la ciencia se comporta de manera desagradecida.

Otra persona a la que debo estar agradecido, y que depositó la suficiente confianza en mí para ver que yo era, o iba a ser, algo más que un alumno interno fue Don **Alberto Machado**, que se portó como un magnífico anfitrión introduciéndome en su departamento y proponiendo mi primer trabajo de experimentación para la beca de colaboración. Desde ese momento no se desinteresó nunca de mi trabajo y sus consejos fueron bien recibidos. Siempre

lo recordaré como un gran sabio, y aunque su jubilación lo haya apartado de nosotros, los frutos de sus enseñanzas aún siguen vigentes.

Hasta ahora todas las personas que he nombrado me han ayudado a configurar la base científica de esta tesis, pero una tesis no se puede transformar en un documento únicamente a base de conocimiento. Hay una parte vital que es la tarea administrativa para hacer que ese conocimiento se pueda dar a conocer. Reconozco que en ocasiones me cuesta lidiar con ciertos trámites burocráticos que a veces me han supuesto verdaderos quebraderos de cabeza. Sin embargo, he tenido la suerte de contar con **Carmen Peña**. A día de hoy, sé que aparte de lo profesional que eres, tendré una persona en la que confiar, y que estará a mi lado cuando necesite de ayuda. Y si algún día ya no estoy en el departamento, echaré de menos tener una profesional como tú con la que reírme y discutir.

Por supuesto, la gran familia de bioquímica, se compone de más personas, y todos ellos, en mayor o en menor medida han contribuido a la causa, por ello tengo que agradecerles a **Afrah, Albert, Alejandro, Elena, Juan, María José, y Rocío**, por su predisposición cuando necesito de sus favores, por su amistad, por compartir los momentos de alegría, por animarnos en los malos momentos, y por las aventuras que aun nos queden por descubrir.

Tampoco podría olvidarme de aquellos que más me han ayudado, y que parte de esta tesis es gracias a ellos. Gracias a **Fran Zurita** porque fue el primero con el que compartí experimentos mano a mano, compartiendo juntos la dureza y la crueldad de lo que es poner a punto las técnicas, pero que supimos solventarlos sin problemas. Compartimos muchas otras cosas, como jugar a fútbol, salir por la noche y esas clases de Bachata que teníamos en los descansos. A **José Ángel Naranjo** que me demostró que las operaciones no debían realizarse a la ligera, y que aunque la música hizo que nos conociéramos, la ciencia ha hecho que nos uniéramos aún más, teniendo un amigo para la posteridad. A **Vicky Ruiz**, porque me ha demostrado ser una gran trabajadora con una inteligencia desbordante, amable y generosa donde las haya, sobre todo cuando toca traer comida y nos deleita con jamón del bueno. A **Leila Berrakad**, que aún no me ha demostrado todo el potencial que hay en ella, y que espero que estas palabras queden pronto obsoletas. Ya suficiente me ha demostrado, y bastantes cosas le he agradecido, pero sé que dentro de ella hay una gran potencial investigadora y que encantado estaría de poder verlo algún día. Han pasado muchos alumnos por este departamento en busca de saciar su sed de conocimientos, algunos con más fortuna que otros, por ello, a los que más orgulloso me he sentido por ver el tiempo que empleaban en aprender

lo que estaban viviendo, quería agradecerles personalmente haberme hecho sentir parte de ese momento, y es a **Vicente, Israel, Manuel Jesús, Anabel y Verónica**. Otra persona que ha trabajado en el laboratorio y la cual le estoy bastante agradecido por la amistad que nos une es a **Nikenza Vicenconte**, la cual admiro y me hubiera gustado haber pasado más tiempo trabajando a su lado, espero que algún día se pueda cumplir.

A **Jaime Muñoz y José Antonio Pintor** tengo que agradecerles enormemente su colaboración en parte de esta Tesis por haber diseñado los lentivirus que he usado para los resultados aquí descritos.

También tengo que agradecer a **Jesús Ruiz** toda la ayuda prestada, toda la atención ofrecida y todo el conocimiento aprendido de la gran persona que es, pues a pesar de ser su cliente, nunca me he sentido como tal. Siempre lo consideraré como un amigo, consejero y profesor. En este sentido también destaco la labor de **Jose Luis Cortés y Paco** (no me sé su apellido) por estar ahí cuando he necesitado algo con urgencia.

A **Modesto Caraballo** también le debo la amabilidad, predisposición y profesionalidad que siempre ha demostrado hacia a mi y que en gran estima tengo. Espero que en futuro podamos compartir más momentos juntos.

Al equipo del profesor **Joao Pedro de Magalhaes** y a él mismo, por haberme concedido la oportunidad de aceptarme en su laboratorio durante mi estancia en Liverpool, donde aprendí no solo conocimientos sino otras culturas diferentes que me enriquecieron enormemente.

Por supuesto esta tesis no se podría haber realizado sin su materia prima fundamental, que son las células madre mesenquimales de tejido adiposo, tejido que ha sido donado gracias a la labor profesional y completamente altruista de dos doctores a los que le estoy muy agradecido: **José Serres y Rocío Vázquez**.

No deseo extenderme mucho más, pero antes de terminar quería a mis familiares y amigos, por su cariño alentador y la estabilidad emocional y sentimental necesaria para realizarlo. Por ello, a pesar de que probablemente no se lo agradezca lo suficiente como debiera en el día a día, aprovecho la ocasión para dar las gracias a **mi padre, a mi madre, a mi Hermana** y a **José** por estar a mi lado y ayudarme a conseguir estos logros. Especialmente a **mi madre**, la cual siempre apostó por mí, y creyó verdaderamente en mis cualidades, y lo sacrificó todo porque yo pudiera continuar mi sueño, incluso por encima de su felicidad. Por

ello, le estaré eternamente agradecido. Si mucho quiero a mi madre, también del mismo modo quiero a **mi hermana**, en la cual muchas veces pienso, siendo uno de los motores por los que me esfuerzo cada día en mi vida profesional, pues mis sentimientos me exigen que su protección y su futuro sean velados por mí.

Para finalizar, solo decir, que existe una frase con la que me identifico bastante y ha marcado parte de mi vida: “el tiempo pone cada cosa en su lugar”, y esta frase tiene más sentido cuando pienso en la siguiente persona a la que agradecer este trabajo. **Mi Sarita**, el tiempo te puso en mi camino, para darme cuenta de que mirar por el espejo retrovisor de la vida no es la ni la mitad de emocionante que ver el largo camino que nos queda aún por recorrer. Has aportado una estabilidad emocional, un espíritu innovador, una felicidad extrema y muchísimas cosas más, y las que aún están por llegar, a mi vida. Porque aunque no hayas estado pinchando ratas, cultivando células, haciendo westerns, inmunos... has estado apoyándome ante la adversidad y la prosperidad, así como en la enfermedad y en la salud, amándome y respetándome hasta que esta tesis fue concluida, y que espero que continúes haciéndolo muchos años más.

Sin más dilación, también agradezco a todo lector que muestre interés por la presente Tesis, al cual le deseo que disfrute de su contenido. MUCHAS GRACIAS.





<b>SUMMARY (ENGLISH)</b> .....	ix
<b>GLOSARIO</b> .....	xv
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
I.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	3
I.2 CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES Y SUS APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA .....	4
I.2.1 Tipos de Células Madre (SCs) .....	4
I.2.2 Células Madre Mesenquimales (MSCs) .....	6
I.2.2.1 Ventajas de las ADSCs frente a las células madre mesenquimales obtenidas de otros tejidos .....	9
I.2.3 Propiedades biológicas de las MSCs .....	10
I.2.4 Terapia celular con ADSCs .....	11
I.3 RUTAS BIOQUÍMICAS IMPLICADAS EN EL ESTADO DE POTENCIALIDAD Y SUS MECANISMOS DE AUTO-RENOVACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE .....	16
I.4 RUTAS BIOQUÍMICAS IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACION DE LAS CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES (MSCs) .....	18
I.4.1 Factores implicados en la osteogénesis.....	19
I.4.2 Factores implicados en la adipogénesis .....	20
I.4.3 Factores implicados en la condrogénesis .....	22
I.4.4 Vías de señalización para el control de la diferenciación osteogénica y adipogénica. 22	
I.4.5 Implicación del Factor de Transcripción Sox2 en el control de la diferenciación osteogénica y adipogénica en MSCs .....	24
I.4.6 Implicación de SIRT1 y AMPK en la diferenciación de MSCs .....	25
I.5 IMPLICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN CÉLULAS MADRES .....	28
I.6 EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LAS MSCs.....	31
I.6.1 Rutas bioquímicas implicadas en el envejecimiento .....	31
I.6.2 Efecto del envejecimiento en las MSCs.....	33
I.7 PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS MSCs .....	34
I.8 SEGUIMIENTO CELULAR MEDIANTE EL USO DE GENES INDICADORES GFP- LUC.....	36
I.9 POSIBLE APLICACIÓN DE LAS MSCs EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON ..	38
I.10 CRIOPRESERVACIÓN .....	40
<b>II. AIMS (ENGLISH)</b> .....	43

<b>III PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	47
III.1 APARATOS .....	49
III.2 ORIGEN DE LAS MUESTRAS .....	50
III.2.1 Animales .....	50
III.2.2 Humanas .....	50
III.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	50
III.3.1 Estudio en las células madre de tejido adiposo de animales (rADSCs) y de humanos (hADSCs) de distintas edades .....	50
III.3.2 Estudio de células madre rADSCs después del tratamiento <i>in vivo</i> de los animales con hidróperóxido de cumeno (CH) .....	50
III.3.3 Seguimiento <i>in vivo</i> de células madre rADSCs tras el implante de rADSCs-GFP-Luc <sup>+</sup> .....	51
III.3.4 Inyección de las rADSCs en diversas zonas anatómicas del animal .....	51
III.3.5 Experimentos sobre el posible uso de las rADSCs en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson .....	51
III.4 METODOLOGÍAS .....	52
III.4.1 Aislamiento, recogida y separación de la fracción vascular estromal (SVF) de tejido adiposo de rata .....	52
III.4.2 Aislamiento, recogida y separación de la fracción vascular estromal (SVF) de tejido adiposo de humano .....	52
III.4.3 Cultivo de la SVF de tejido adiposo de rata .....	53
III.4.4 Tripsinización, etiquetado y separación magnética de las células madre de tejido adiposo de rata (rADSCs) y humano (hADSCs) .....	54
III.4.5 Cultivo de células HeLa .....	56
III.4.6 Recuento celular y curva de crecimiento .....	56
III.4.7 Criopreservación .....	56
III.4.8 Descongelación .....	57
III.4.9 Determinación de los antígenos de superficie (fenotipado) de las ADSCs mediante citometría de flujo .....	58
III.4.9.1 Calibración del citómetro .....	58
III.4.9.2 Fenotipado de las rADSCs .....	58
III.4.9.3 Fenotipado de las hADSCs .....	59
III.4.10 Pruebas de Multipotencialidad .....	59
III.4.11 Diferenciación celular hasta adipocitos de las rADSCs .....	60
III.4.11.1 Desarrollo .....	60

III.4.11.2 Detección.....	60
III.4.11.3 Cuantificación .....	61
III.4.12 Diferenciación celular hasta adipocitos de las hADSCs .....	61
III.4.12.1 Desarrollo .....	61
III.4.12.2 Detección.....	61
III.4.12.3 Cuantificación .....	61
III.4.13 Diferenciación celular hasta osteoblastos de las rADSCs.....	62
III.4.13.1 Desarrollo .....	62
III.4.13.2 Detección.....	62
III.4.13.3 Cuantificación .....	63
III.4.14 Diferenciación celular hasta osteoblastos de las hADSCs .....	63
III.4.14.1 Desarrollo .....	63
III.4.14.2 Detección.....	63
III.4.14.3 Cuantificación .....	63
III.4.15 Diferenciación celular hasta condroblastos de las rADSCs .....	63
III.4.15.1 Desarrollo .....	63
III.4.15.2 Detección.....	64
III.4.16 Supervivencia de las ADSCs frente al estrés oxidativo provocado <i>in vitro</i> con hidropéroxido de cumeno (CH) y menadiona (MD).....	64
III.4.17 Ensayo de citotoxicidad de las ADSCs .....	65
III.4.18 Ensayo de viabilidad de las ADSCs .....	66
III.4.19 Aislamiento y cuantificación de proteínas solubles citoplasmáticas .....	67
III.4.19.1 Obtención a partir de tejido hepático .....	67
III.4.19.2 Obtención a partir de células madre .....	67
III.4.19.3 Cuantificación .....	67
III.4.20 Determinación de hidroperóxidos lipídicos por oxidación de Fe(II) en presencia de naranja de xilenol (método FOX).....	70
III.4.21 Transfección de los genes indicadores GFP-Luc en las rADSCs usando lentivirus y seguimiento por bioluminiscencia óptica. ....	71
III.4.21.1 Seguimiento de la bioluminiscencia <i>in vitro</i> .....	71
III.4.21.2 Seguimiento de la bioluminiscencia <i>in vivo</i> .....	72
III.4.22 Perfusión, congelación y cortes histológicos. ....	72
III.4.23 Inmunofluorescencia de células <i>in vitro</i> .....	72
III.4.24 Inmunofluorescencia en tejidos.....	73

III.4.25 Inmunohistoquímica.....	74
III.4.26 Análisis estereológico .....	75
III.4.26.1 Análisis de los datos inmunohistoquímicos para OX-6 .....	75
III.4.26.2 Análisis de los datos inmunohistoquímicos para TH.....	75
III.4.27 Análisis estadístico .....	75
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>IV.1 CARACTERIZACIÓN DE CELULAS MADRE HUMANAS DE TEJIDO ADIPOSO (hADSCs) SEGÚN LAS NORMAS DE LA “INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY (ISCT)” .....</b>	<b>79</b>
IV.1.1 Adherencia .....	79
IV.1.2 Fenotipado.....	80
IV.1.3 Multipotencialidad .....	81
<b>IV.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO DE RATA (rADSCs).....</b>	<b>83</b>
IV.2.1 Adherencia .....	83
IV.2.2 Fenotipado.....	84
IV.2.3 Multipotencialidad .....	86
<b>IV.3 ESTUDIOS COMPARATIVOS CELULARES Y TISULARES EN DISTINTAS EDADES DE HUMANOS Y RATAS.....</b>	<b>88</b>
IV.3.1 Ratios de aislamiento en ratas .....	88
IV.3.2 Peroxidación lipídica en extracto de hígado de rata .....	90
IV.3.3 Variaciones de los niveles de proteínas implicadas en rutas bioquímicas de longevidad .....	90
IV.3.3.1 Células hADSCs .....	90
IV.3.3.2 Células rADSCs y de tejido hepático de rata.....	92
IV.3.4 Evaluaión de la potencialidad de las células madre mediante la determinación de los niveles de las proteínas Nanog y Sox2.....	95
IV.3.4.1 Células hADSCs .....	95
IV.3.4.2 Células rADSCs .....	96
IV.3.5 Cuantificación de la diferenciación hasta adipocitos de las células ADSCs de distintas edades.....	97
IV.3.5.1 Células hADSCs .....	97
IV.3.5.2 Células rADSCs .....	98
IV.3.6 Cuantificación de la diferenciación hasta osteoblastos de las células ADSCs de distintas edades.....	100

IV.3.6.1 Células hADSCs .....	100
IV.3.6.2 Células rADSCs .....	101
IV.4 RESISTENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO <i>IN VITRO</i> DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO.....	102
IV.4.1 Células hADSCs .....	102
IV.4.1.1 Viabilidad con hidroperóxido de cumeno (CH) y con menadiona (MD) .....	102
IV.4.1.2 Viabilidad con menadiona. Comparación con la edad.....	103
IV.4.1.3 Viabilidad con hidroperóxido de cumeno. Comparación con la edad .....	106
IV.4.2 Células rADSCs .....	106
IV.4.2.1 Viabilidad con hidroperóxido de cumeno. Comparación con la línea celular HeLa y hADSC .....	106
IV.4.2.2 Efecto del hidroperóxido de cumeno sobre la viabilidad de las rADSCs según el medio de criopreservación (dimetilsulfóxido, suero bovino fetal) y el tiempo transcurrido después de la descongelación.....	108
IV.5 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> DE LAS RATAS CON HIDROPERÓXIDO DE CUMENO .....	110
IV.5.1 Efecto del tratamiento en el peso de los animales .....	110
IV.5.2 Ratios de aislamiento .....	111
IV.5.3 Peroxidación lipídica en extractos de hígados de rata .....	112
IV.5.4 Variaciones de los niveles de proteínas implicadas en rutas bioquímicas de longevidad .....	113
IV.5.5 Evaluación de la potencialidad de las rADSCs mediante la determinación de los niveles de las proteínas Nanog y Sox2 en el tratamiento <i>in vivo</i> con CH.....	116
IV.5.6 Cuantificación de la diferenciación hasta adipocitos de las rADSCs .....	117
IV.5.7 Cuantificación de la diferenciación hasta osteoblastos de las rADSCs .....	118
IV.6 APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO EN TERAPIA CELULAR .....	119
IV.6.1 Método de seguimiento de las rADSCs .....	119
IV.6.2 Confirmación de la transfección del plásmido pSIN-Dual-Luciferasa-GFP2 en las rADSCs .....	119
IV.6.3 Seguimiento “ <i>in vivo</i> ” de las rADSCs-GFP-Luc+ tras implante local y sistémico	122
IV.6.4 Visualización de las rADSCs-GFP-Luc <sup>+</sup> en los diferentes implantes mediante técnicas inmunológicas .....	125
IV.7 USO POTENCIAL DE LAS CELULAS rADSC COMO TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON .....	136

IV.7.1 Efecto de las rADSCs implantadas en sustancia nigra (SN) de ratas tratadas con LPS .....	137
IV.7.2 Determinación de la activación microglial tras terapia celular con rADSCs mediante análisis estereológico de OX-6.....	143
IV.7.3 Cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas tras terapia celular con rADSCs mediante análisis estereológico de TH .....	145
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	147
V.1 CARACTERIZACIÓN (ADHERENCIA, FENOTIPADO, MULTIPOTENCIALIDAD) DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO (hADSC) Y DE RATA (rADSC) .....	150
V.2 EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LAS ADSCs.....	154
V.3 ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO DE LAS RATAS CON HIDORPERÓXIDO DE CUMENO SOBRE LAS rADSCs .....	162
V.4 EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA RESISTENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO <i>IN VITRO</i> DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO.....	166
V.5 APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO EN TERAPIA CELULAR .....	167
V.6 USO POTENCIAL DE LAS rADSCs COMO TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON .....	171
<b>VI. CONCLUDING REMARKS (ENGLISH)</b> .....	175
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	179



---

## **SUMMARY (ENGLISH)**



The present thesis is a compilation of several experiments about the use of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) in cell therapy. The study focus on the behavior, molecular mechanisms and environment changes of these cells during aging and under oxidative stress, that could determine its efficacy in Regenerative Medicine. Adipose tissue has proven to serve as an abundant, accessible and rich source of adult stem cells with multipotent properties suitable for tissue engineering and regenerative medical applications. In the first part, we presented and described in detail the isolation methods, expansion, differentiation and cryopreservation of adipos-derived stem cells (ADSCs). The International Society for Cellular Therapy (ISCT) has proposed a set of standards to define human mesenchymal stem cells (hMSCs) for laboratory investigations and preclinical studies. ISCT believes this minimal set of standard criteria will foster a more uniform characterization of MSCs and facilitate the exchange of data among investigators. These criteria are adherence to plastic in standard culture conditions; “in vitro” differentiation into osteoblasts, adipocytes, and chondroblasts; specific surface antigen expression in which 95% of the cells express the antigens CD105, CD73, and CD90, with the same cells lacking (2% positive) the antigens CD45, CD34, CD14 and CD11b, CD79a or CD19, and HLA-DR. In case of murine models these criteria have not been established yet, though many authors try mimic them.

There is considerable evidence that cellular senescence and replicative exhaustion impair the regenerative potential of adult stem cells, a characteristic they share with normal somatic cells. The effects of oxidative stress on MSCs are still unknown. Reactive oxygen species (ROS) are oxygen-derived small molecules, which react readily with a variety of chemical structures such as proteins, lipids, sugars, and nucleic acids, that lead to cellular damage in aging. Nowadays, it is increasingly recognized that ROS are involved in the regulation of cell function despite the fact that for many years they were considered to be harmful elements in biological systems. Despite the enormous effort that has thus far been invested into clinical trials, the importance of ROS in the outcome has not sufficiently considered. It has been proposed that the high antioxidant capacity of MSCs makes them ideal for the treatment of pathologies in which tissue damage is linked to oxidative stress. Nonetheless, not all levels of ROS cause cell damage by oxidation and nitration of macromolecules. It is currently believed that only unregulated levels of ROS are harmful, while regulated ROS production promotes essential signaling pathways, which regulate cell functions such as cell proliferation, differentiation, survival, and apoptosis. Redox regulation or controlled ROS generation is the net effect of a subtle balance between ROS generation

and neutralization/utilization by cellular antioxidant systems. Thus, oxidative stress represents an unbalanced situation in which ROS generation exceeds antioxidant systems leading to tissue damage. The responses of adult human stem cells to different stress stimuli such as oxidative stress, heat shock, and  $\gamma$ -radiation have been widely studied in the context of tissue repair, tissue engineering, and transplantation. As far as this thesis is concerned, we show how MSCs promote the increased adipogenic fate and suppresses the osteogenic lineage mediated by ROS, due to a deregulation of pluripotential factors Nanog and Sox2.

Recently, MSCs therapies have come under criticism as, despite decades of research, relevant translational questions of MSCs biology and function remain unanswered. Previous studies showed that MSCs suffer from several drawbacks hampering clinical applications including, decreased number and quality of cells with donor age, and loss of proliferation and differentiation potential upon expansion “in vitro”. These observations pose a significant challenge that must be overcome in order to enable cellular therapies for older patients, the population mostly in need for tissue replacement. Hereby, aged-related variations could be identified, with correlation analyses of functional properties like protein homeostasis, resistance to oxidative stress, differentiation capability and pluripotentiality. Besides the individual age of the cell, stem and progenitor cells functions are influenced by the cellular environment, i.e. the niche and the architecture of the tissue they reside in.

An other issue, we have addressed how to track the processes that happen before, during and after the stem cell engraftment using gene reporters in investigation. Optical imaging technologies combined with the use of genetically encoded fluorescent and luminescent proteins have enabled the visualization of stem cells over periods of time *in vivo* and *ex vivo*. Bioluminescence imaging (BLI) provides a means for monitoring physiological processes in real time, ranging from cell survival to gene expression to complex molecular processes. BLI provides unmatched sensitivity because of the absence of endogenous luciferase expression in mammalian cells and the low background luminescence emanating from animals. In the field of stem cell therapy, BLI provides an unprecedented means to monitor the biology of these cells *in vivo*. Our results show that multimodal tracking of adipose-derived stem cells labeled in central nervous system, allows localization as well as cell identification after engraftment. This system has the advantages of avoiding the dilution with each cellular division, accurate to assess cell viability to track engraftment, have a linear relationship between substrate and photon emission and mark cells to track them by immunofluorescence and immunohistochemistry cells. Some disadvantages are gene reporter

is inserted in DNA in unspecific places, not good promoters not good expression and signal, and the substrate distribution depends on many factors like delivery route, type of anesthesia and the host environment can also influence.

To end up, MSCs should have the potential to stimulate the endogenous neurogenesis. It is commonly assumed that MSCs exert their therapeutic effects through immunomodulatory and trophic factor release rather than through cell replacement. It has been shown that ADSCs can ameliorate Parkinson disease symptoms by autologous transplantation into the rat. Thus far, the mechanisms of potential neuroprotective and regenerative effects of ADSCs are not fully understood because they have only been investigated several weeks after transplantation. In our case, we have studied the effect in a later period of time (four months). Although the acute effects would be particularly interesting, given that MSCs are often not detectable anymore at later time points, raising the question of how these cells actually achieve their results.







**A.**

**$\alpha$ -MPT:**  *$\alpha$ -Metilparatirosina*. Inhibidor de la enzima tirosinhidroxilasa.

**$\alpha$ -Tub:**  *$\alpha$ Tubulina*. Proteína Citoesquelética. Útil como control de carga.

**3T3-L1:** Línea celular de ratón para estudios de diferenciación a adipocitos.

**6-OHDA:** *6-Hidroxidopamina*.

Compuesto usado en modelo animal de Parkinson.

**ABC KIT:** *Avidine-Biotin-Complex*.

Amplifica revelado con DAB

**ADSCs:** *Adipose-derived stem cells*.

Células madre de tejido adiposo (hADSCs) para humanos y (rADSCs) para ratas.

**Akt:** *Protein Kinase B*.

**AMPK $\alpha$ :** *AMP-activated protein kinase*.

**AP:** *Alkaline Phosphatase*.

**APC:** *Allophycocyanin*. Fluorocromo.

**APCs:** *Antigen presenting cells*. Células presentadoras de antígenos.

**APS:** *Ammonium persulfate sodium*.

Agente polimerizador de acrilamida.

**ASCs:** *Adult stem cells*. Células madre adultas.

**ASGPR1/2:** *Asialoglycoprotein receptor*.

Proteína presente en hepatocitos.

**ATP:** *Adenosin-5'-triphosphate*.

**B.**

**BCIP:** *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate*. Agente cromógeno.

**BMP:** *Bone morphogenic protein*.

Proteínas implicadas en la formación ósea.

**C.**

**C/EBP $\alpha$ :** *CCAAT/Enhancer binding protein alpha*. Proteína implicada en adipogénesis.

**C3H10T1/2:** Línea celular de células embrionarias de ratón.

**C57BL/6:** Cepa de ratón.

**CaMKK $\beta$ :** *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase beta*.

**CD:** *Cluster of differentiation*. Marcadores antigénicos de superficie. Van precedidos de un número, ej.: CD90, CD11b, CD271...

**CHOP-10:** *C/EBP homologous protein-10*.

**c-Myc:** Factor de transcripción

relacionado con la proliferación.

**CR:** *Caloric restriction*. Restricción calórica.

**CSK:** *Casein kinase*.

**D.**

**DA:** *Dopamine*.

**DAB:** *3,3'-Diaminobenzidine*. Cromógeno.

**Dkk1:** *Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*. Proteína inhibidora de la vía de señalización Wnt.

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Medio de cultivo basal.

**DMSO:** *Dimetilsulfóxido*. Crioprotector.

**DPX:** *Distyrene-plasticiser-xylene*. Medio de montaje para histología.

**E.**

**EDTA:** *Ethylenediaminetetraacetic acid*. Agente quelante.

**eEF2:** *Elongation Factor-2*. Proteína que interviene en la síntesis de proteínas.

**EGTA:** *Ethyleneglycoltetraacetic acid*. Agente quelante.

**ERK-1:** *Extracellular signal-regulated kinase*.

**F.**

**FABP4:** *Fatty acid binding protein 4*.

Proteína presente en adipocitos.

**FBS:** *Fetal Bovine Serum*. Componente de los medios de cultivo.

**FITC:** *Fluorescein isothiocyanate*.

Fluoróforo.

**G.**

**GPDH:** *Glycerol 3-phosphate dehydrogenase*. Proteína presente en mayor cantidad en adipocitos.

**GADPH:** *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*. Proteína usada como control de carga.

**GATA4/6:** *GATA binding protein 4/6*.

Factor de transcripción.

**GFP:** *Green fluorescent protein*. Marcador de fluorescencia.

**GSK3 $\beta$ :** *Glycogen synthase kinase 3 beta*.

**GTP:** *Guanosine-5'-triphosphate*.

**H.**

**HeLa:** Línea celular inmortalizada.

**HEPES:** *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*.

**HIF-1 $\alpha$ :** *Hypoxia-inducible factor-1alpha*.

**HSCs:** *Hematopoietic stem cells*.

**I.**

**Iba1:** *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*. Proteína presente en microglía y macrófagos.

**IFN $\gamma$ :** *Interferon-gamma*.

**IGF:** *Insulin-like growth factor*.

**IL:** *Interleukin*. Citoquinas inmunomoduladoras, suelen describirse como IL más número y/o símbolos, ej.: IL-6, IL-1 $\beta$ ... Presentando distintas propiedades.

**iPSCs:** *Induced pluripotent stem cell*.

**J.**

**JNK:** *c-Jun N-terminal kinases*.

**K.**

**Klf4:** *Kruppel-like factor 4*. Factor de transcripción relacionado con la potencialidad celular.

**L.**

**LEF/TCF** *Lymphoid enhancer-binding factor 1/Transcription factor*. Factor de transcripción.

**LiCl:** Cloruro de Litio.

**LKB1:** *Liver kinase B1*.

**LPS:** *Lipopolysaccharides*.

**Luc:** *Luciferasa*. Enzima que cataliza una reacción bioluminiscente.

**M.**

**MACS:** *Magnetic-activated cell sorting*.

**MAPKs:** *Mitogen-activated protein kinases*.

**MC3T3-E1:** Línea celular osteoblástica de ratón.

**MD:** *Menadione*. Agente peroxidante.

**MFB:** *Medial forebrain bundle*. Tracto de fibras dopaminérgicas que une SN con Estriado

**MCH:** *Major histocompatibility complex*.

**MPTP:** *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*.

**MOI:** *Multiplicity of Infection*. Ratio de la transfección.

**MSCs:** *Mesenchymal stem cells*.

**mTOR:** *mammalian target of rapamycin*.

**MTS:** *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*. En presencia de phenazine methosulfate **PMS**, produce formazán.

**N.**

**NADPH:** *Nicotinamide adenine*

*dinucleotide phosphate reduced*.

**Nampt:** *Nicotinamide phosphoribosyltransferase*.

**Nanog:** Factor de transcripción relacionado con la potencialidad celular.

**NBT:** *Nitro blue tetrazolium*. Agente cromógeno.

**NeuN:** *Neuronal nuclei*. Marcador nuclear de neuronas.

**NF $\kappa$ B:** *Nuclear factor-kappaB*.

**NH:** *Non-Hematopoietic*. Referido también al uso de medio de cultivo específico para células madre

mesenquimales humanas de la empresa Miltenyi Biotec.

**Nox:** *NADPH oxidase*.

**NSCs:** *Neural stem cells*.

**O.**

**Oct3/4:** *Octamer-binding transcription factor 4*. Factor de transcripción relacionado con la potencialidad celular.

**OX-6:** Anticuerpo obtenido del clon OX-6 que detecta el complejo de mayor histocompatibilidad III. Marcador de microglía activada.

**P.**

**p/s/cm<sup>2</sup>/sr:** *Unidades de fotones x segundos<sup>-1</sup> x centímetro<sup>-2</sup> x estereorradianes<sup>-1</sup>*.

**p16:** *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2<sup>a</sup>*. Detención del ciclo celular.

**p19:** *Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D*. Detención del ciclo celular.

**p38:** *P38 mitogen-activated protein kinase*. Implicado en diferenciación, apoptosis y autofagia.

**PAGE:** *Polyacrylamide gel electrophoresis*.

**PAMPs:** *Pathogen-associated molecular patterns*.

**PBS:** *Phosphate buffer saline*. Tampón fosfato salino.

**PCR:** *Polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la Polimerasa.

**PD:** *Parkinson Disease*.

**PDGFR- $\beta$ :** *Beta-type platelet-derived growth factor receptor*.

**PE:** *Phycocerythrin*. Fluoróforo.

**PerCP:** *Peridinin chlorophyll*. Fluoróforo.

**PGC1 $\alpha$** : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha.

**PGE**: Prostaglandin E.

**PI3K**: Phosphoinositide 3-kinase.

**PKA**: Protein kinase.

**poli(I:C)**: Polyinosinic-polycytidylic acid.

**PPAR $\gamma$** : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

**PVP**: Polyvinylpyrrolidone. Crioprotector.

**R.**

**RIPA**: Radioimmunoprecipitation assay buffer. Tampón de homogenizado.

**ROS**: Reactive oxygen species.

**Runx2**: Runt-related transcription factor 2.

**S.**

**SA-ADSCs**: Células estromales adiposas supra-advénticiales.

**SC**: Stem Cells

**SDF-1 $\alpha$** : Stromal cell derived factor 1-alpha.

**SDS**: Sodium dodecil sulfate.

**SIRT1**: Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1.

**SMADs**: Mothers against decapentaplegic homolog.

**Smo**: Smoothened.

**SN**: Substantia Nigra.

**SNpc**: Substantia nigra pars compacta

**SNC**: Sistema nervioso central.

**Sox2**: Sex determining Region Y-box 2. Factor de transcripción relacionado con la potencialidad celular.

**SP**: Progenitores subendoteliales.

**SP-TP**: Población transitoria de

progenitores subendoteliales.

**SREBP1**: Sterol regulatory element-binding proteins 1.

**SVF**: Stromal vascular fraction.

**T.**

**TAK1**: Transforming growth factor beta-activated kinase 1.

**TAZ**: Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif.

**TCA**: Trichloro acetic acid.

**TEMED**: Tetramethylethylenediamine. Agente polimerizador de la acrilamida.

**TGF- $\beta$** : Transforming growth factor beta 1.

**TH**: Tyrosine hydroxylase.

**TLR**: Toll-like receptors.

**TNF $\alpha$** : Tumor necrosis factor.

**TSG6**: Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein.

**V.**

**VW-EPCs**: Células progenitoras endoteliales residentes en la pared vascular.

**VW-HPCs**: Células progenitoras hematopoyéticas residentes en la pared vascular.

**W.**

**WB**: Western Blot.

**WFPCs**: Células progenitoras de la grasa blanca.

**Wnt**: Wingless-related integration site.

**Y.**

**YAP1**: Yes-associated protein 1.



# **I. INTRODUCCIÓN**

---



## I.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

“Envejecer es todavía el único medio que se ha encontrado para vivir más tiempo”. La autoría de estas palabras pertenecen al escritor francés Charles Augustin Sante-Beuve que reflejan que la única manera que tienen los seres vivos de vivir durante más tiempo es envejeciendo. Pero existe otra cita de cierta comicidad de Woody Allen que refleja el transcurso natural de la vida. El director y actor, afirma que “envejecer no es ninguna ventaja, no le gusta a nadie. Empiezan a sucederte cosas malas y las opciones se reducen”. Ambas citas reflejan la dualidad que siempre ha perseguido el ser humano. Vivir una vida plena durante el mayor tiempo posible, pero temiendo las consecuencias de su propio desvanecimiento. Independientemente de la visión filosófica, el envejecimiento se puede definir como la pérdida de las funciones óptimas de un organismo con el paso de los años. Es un fenómeno progresivo e inevitable, pero influenciado, es decir, se puede acelerar o retardar. En este contexto, uno de los retos de la Medicina es identificar y actuar sobre los factores que lo aceleran o lo enlentecen, para promover un estilo de vida saludable, fomentando no sólo que se viva más años sino que se retrase la aparición de enfermedades asociadas a la edad.

Este objetivo de vivir más y mantener la salud el mayor número de años posibles ha sido desde siempre una aspiración del ser humano y, sin duda, los grandes avances científicos en los distintos campos a finales del siglo XIX y principios del XX contribuyeron a mejorar las expectativas de vida. El tratamiento farmacológico y los nuevos avances médicos propiciaron que las enfermedades con elevadas tasas de mortalidad, prácticamente, se erradicasen, lo que contribuyó, junto con un mejor desarrollo socioeconómico, a un aumento de la vida media. Este hecho conllevó, a su vez, a un aumento paralelo de las enfermedades asociadas a la edad, que habían estado silenciadas debido a la temprana mortalidad.

Las estrategias de intervención para controlar el envejecimiento y enfermedades relacionadas son la nutrición, el ejercicio, evitar hábitos tóxicos o negativos para la salud, la resistencia al estrés y la psicología positiva, la identificación de carencias o déficits y su correspondiente aporte, así, como el uso de medios diagnósticos avanzados que permitan no sólo detectar la enfermedad de manera muy precoz sino también conocer la susceptibilidad individual a padecer ciertas enfermedades, poniéndose los medios adecuados para evitar o limitar su desarrollo. También, se ha avanzado mucho en el desarrollo de fármacos y principios activos naturales y de síntesis, al mismo tiempo que se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas.

Junto con todos estos avances se ha abierto un nuevo frente consistente en un conjunto de terapias innovadoras que, tomadas en conjunto, se engloban bajo la denominación de Medicina Regenerativa, y que incluye la terapia celular, la ingeniería de tejidos y biomateriales, el uso de factores de crecimiento, terapia génica, y los trasplantes. El objetivo final de todas estas terapias innovadoras es reparar, reemplazar y regenerar células, tejidos y órganos dañados o con algún tipo de patología. Actualmente, estas estrategias terapéuticas están siendo objeto de muchos estudios en enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, demencia senil, discinesias, etc), enfermedades endocrinas (diabetes), y grandes traumatismos que conllevan paraplejia o tetraplejia. Puesto que potencialmente se puede utilizar en la regeneración de tejidos, la Medicina Regenerativa se va a convertir a corto plazo en una de las estrategias de intervención para el control del envejecimiento. De todas ellas, la terapia con células madre adultas es a la que se le presta más atención. Estas investigaciones han crecido de forma sustancial a partir de la década de los 90 (English, 2003). Aunque al principio se aislaron, principalmente, a partir de células madre de cordón umbilical, posteriormente se han tomado como fuentes usuales otros tejidos como medula ósea y tejido adiposo. Concretamente, las células madre mesenquimales obtenidas a partir de tejido adiposo (ADSCs)<sup>1</sup> que son las células objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

## **I.2 CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES Y SUS APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA**

### **I.2.1 Tipos de Células Madre (SCs)**

Una célula madre es un tipo especial de célula capaz de auto-renovarse y diferenciarse a través de diversos linajes para dar lugar a células especializadas (Bruder *et al.*, 1997; English, 2003; Ho *et al.*, 2005; Gimble *et al.*, 2007; Bajada *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2015; Kapur *et al.*, 2015). Actualmente, se sabe que la mayoría de los tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células madre adultas (ASCs) que permiten su renovación periódica o su regeneración (como la piel o la sangre) (Bajada *et al.*, 2008; Teo and Vallier, 2010; Han *et al.*, 2015). Así, se ha descrito la existencia de estas SCs en tejidos como el músculo, piel, hígado, páncreas, cerebro (Burns *et al.*, 2009), intestinos y tejido graso (Zuk *et al.*, 2002; Schäffler and Büchler, 2007).

---

<sup>1</sup> La mayoría de acrónimos usados hacen referencia a las siglas en inglés.

En los animales superiores, las células madre se han clasificado en varios grupos, de acuerdo con su capacidad de transformarse en un mayor o menor número de células diferentes. El mayor grado de potencialidad lo tiene el cigoto, considerado “totipotente”, pues puede generar todos los tipos celulares posibles, tanto embrionarios como extraembrionarios (Hyslop *et al.*, 2005). Sin embargo, el cigoto, al ser transitorio y no autorrenovarse, no está generalmente aceptado como una célula madre. Las células madre embrionarias (ESC) derivan de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto 4-14 días (Ho *et al.*, 2005; Bajada *et al.*, 2008). Estas células son “pluripotentes”, dando lugar a todos los tipos de células derivadas de las tres capas germinales que se encuentran durante el desarrollo embrionario, no pudiendo dar lugar a los tejidos anejos al embrión: placenta y cordón umbilical (Teo and Vallier, 2010). En cuanto a las células madre adultas, también conocidas como órgano-específicas, somáticas o células madre no embrionarias, se las considera con capacidad “multipotente”, cuya multipotencialidad varía en función del tejido, es decir, están limitadas a originar las células de un órgano concreto en el adulto (Bajada *et al.*, 2008). Un ejemplo son las células madre hematopoyéticas (HSCs), que residen en la médula ósea y se transforman en todas las células sanguíneas (Ho *et al.*, 2005; Teo and Vallier, 2010; Kapur *et al.*, 2015). Sin embargo, muchas de estas células procedentes de un tejido determinado pueden diferenciarse a células de distintas estirpes (Hipp and Atala, 2008; Tallone *et al.*, 2011; Ogura *et al.*, 2014), con una capacidad más limitada que las ESCs (Ho *et al.*, 2005). Por tanto, existe una gran controversia sobre si son multipotenciales o pluripotenciales. Hoy en día parece que, al menos las células madre mesenquimales (MSCs), tienen la capacidad de originar cualquier célula de cualquier tejido y, por tanto, son pluripotenciales (Hipp and Atala, 2004) y su actividad varía mucho de unos órganos a otros (Teo and Vallier, 2010).

En los últimos años han aparecido otro tipo de células madre, las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Se trata de simples células somáticas diferenciadas que tras su reprogramación celular, son capaces de adquirir pluripotencialidad (Teo and Vallier, 2010), tanto *in vitro* como *in vivo* (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yamanaka, 2008; Hanna *et al.*, 2010). Uno de los métodos con los que se consigue la reprogramación (desdiferenciación) de células somáticas es la transferencia nuclear de células somáticas. Lo sorprendente de esta “reprogramación” es que se necesitan sólo 4 genes (Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4) para conferir pluripotencialidad a fibroblastos de ratón. Estos estudios se ampliaron a fibroblastos humanos, y se obtuvieron similares resultados *in vivo* (Takahashi *et al.*, 2007).

## I.2.2 Células Madre Mesenquimales (MSCs)

Las MSCs forman parte del mesénquima, que da lugar, por un proceso de diferenciación tisular, a vasos sanguíneos, músculo liso, mesotelio, sistema linfático y tejido conectivo propiamente dicho. Estas células se han obtenido a partir de diferentes órganos, como hígado fetal, cordón umbilical y, más frecuentemente, médula ósea (Kern *et al.*, 2006). Otra fuente importante es el tejido adiposo, el cual contiene células progenitoras tripotentes conocidas bajo la denominación de células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) (Schäffler and Büchler, 2007; Gimble *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2015). El auge que ha experimentado el uso de estas células en clínica ha provocado que se hayan descubierto MSCs en diferentes lugares anatómicos y se hayan obtenido mediante diferentes métodos. Debido a la heterogeneidad de las fracciones vasculares estromales a partir de las cuales se obtienen este tipo de células madre, ha sido necesario acordar una adecuada terminología, además de criterios para evitar posibles discordancias en el uso de este tipo de células en la práctica clínica. Existen actualmente dos Comités que se han creado para unificar criterios en torno a este tipo de células: “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee (MTSCC)”, e “International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS)”, ambos pertenecientes a la “International Society for Cellular Therapy (ISCT)”.

La mayoría de los métodos de obtención de MSCs tienen un punto en común, que es la obtención de la fracción vascular estromal (SVF) tras la digestión enzimática del tejido con colagenasa. A partir de las liposucciones se obtiene una mezcla heterogénea de fracción estromal derivada del tejido adiposo, fuente común de distintos tipos celulares como, por ejemplo células endoteliales, eritrocitos, fibroblastos, linfocitos, monocitos/macrófagos, pericitos, *etc* (Bourin *et al.*, 2013) localizadas en las paredes de los vasos sanguíneos. A partir del estroma vascular del tejido adiposo (Friedenstein *et al.*, 1974; Owen, 1988) se separan las células adherentes al plástico con capacidad multipotente. Se trata de las células estromales mesenquimales (Caplan, 1991).

En esta fracción (SVF) se encuentran las poblaciones celulares que diferirán aún más entre sí dependiendo del tejido donde se haya producido el aislamiento, como médula ósea, tejido muscular, cordón umbilical, pulpa dental o tejido adiposo. Debido a que la SVF se obtenía a partir de diferentes fuentes y mediante diversas técnicas, con ligeras variaciones en sus propiedades, se les ha ido asignando una nomenclatura descriptiva sin ningún tipo de consenso internacional. Un ejemplo de ello lo tenemos en Zuk *et al.*, (2001), que describieron

las células con capacidad multipotente del tejido graso como células PLA, porque se obtenían a partir de los lipoaspirados.

En la última década ha habido numerosas confusiones acerca de la nomenclatura de las MSCs, sobre todo en las derivadas de tejido adiposo, aunque las células mesenquimales obtenidas de médula ósea tampoco están exentas de confusión. De hecho, la ISCT da por válido el uso del acrónimo “MSCs”, tanto para las células madre mesenquimales como para las células estromales mesenquimales, aunque para ello se deben esclarecer qué tipo de población celular se está manejando (Horwitz *et al.*, 2005). Refiriéndonos a las células madre mesenquimales que se obtienen de la SVF del tejido adiposo podemos encontrar en la literatura científica términos como: células madre adultas derivadas de tejido adiposo (ADAS) (Katz *et al.*, 2005), células estromales derivadas de tejido adiposo (ADSCs) (Han *et al.*, 2015), células del estroma adiposo (ADSCs) (Safford *et al.*, 2002), células madre mesenquimales del tejido adiposo (AdMSCs) (Chen *et al.*, 2014b), preadipocitos (Charrière *et al.*, 2003), células procesadas de lipoaspirado (PLA) (Zuk *et al.*, 2001), lipoblastos, y pericitos (Corselli *et al.*, 2012). Todas ellas con reconocida capacidad multipotente. Debido a ello, se establecieron para estas células una serie de criterios mínimos que deberían cumplir para poder denominarse con autenticidad “células madre mesenquimales” (MSCs). Esos criterios han sido definidos por los comités mencionados anteriormente, y son los siguientes:

- Ser adherentes al plástico, bajo condiciones estándares de cultivo.
- Expresar, al menos, los marcadores antigénicos CD73, CD90 y CD105.
- Ser negativas para los marcadores que se expresan en el linaje hematopoyético c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 $\alpha$  y antígeno leucocitario humano (HLA)-DR.
- Demostrar multipotencialidad, diferenciándose, al menos, hasta osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Además de este perfil de expresión de genes y marcadores, en la literatura científica podemos encontrar toda una gama de distintos genes y marcadores que caracterizan a este tipo de células (Gronthos *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006; Poloni *et al.*, 2013). De hecho, el marcador de superficie que hemos utilizado para purificar la población de MSCs a partir de la SVF ha sido el antígeno de superficie CD271 (p75LNGF), descrito en MSCs humanas de médula ósea y tejido adiposo, con capacidad altamente clonogénica y marcado potencial para la producción de los osteoblastos y adipocitos (Quirici

*et al.*, 2002; Gregory *et al.*, 2005). Aunque estos criterios aún se mantienen vigentes (Sousa *et al.*, 2014), Dominici *et al.*, (2006) ya sugirieron que con el avance de los descubrimientos esos criterios deberían extenderse. Es en 2013 cuando Bourin *et al.*, (2013), en el artículo publicado bajo reconocimiento de la IFATS, amplifica los anteriores criterios, proponiendo como principales marcadores positivos a CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 (>80% en ADSCs); como marcador positivo variable a CD34; como marcadores negativos a CD31, CD45, CD235a (<2%); como marcadores alternativos positivos secundarios a CD10, CD26, CD36, CD49d, CD49e; y como marcadores alternativos negativos secundarios a CD3, CD11b, CD49f y CD106, además de determinar factores de diferenciación mediante PCR. Sin embargo, este intento de especificar con más exactitud las poblaciones contenidas en la SVF de tejido adiposo lo hace aún más abierto y menos útil que los criterios anteriores. De ahí que los establecidos por la ISCT en 2006 sigan vigentes (Murray *et al.*, 2014), y estos más recientes sirvan como orientación para identificar con más exactitud diferente poblaciones contenidas en la SVF de tejido adiposo. De hecho, el estudio de Bourin *et al.*, (2013) se realiza con una población de SVF de tejido adiposo que ha sido cultivada para aislar a las células adherentes al plástico de esa SVF denominándola como Adipose stem cells (ASCs). En ningún momento se plantea la posibilidad de que las células puedan ser purificadas mediante aislamiento inmunomagnético hasta una población más homogénea que cumpla exclusivamente los criterios de MSCs exigidos por la ISCT. Al no contemplar esa posibilidad, no dota, a este tipo de células de una nomenclatura concreta. Por lo tanto, a pesar de la recomendación de la IFATS, no hay claridad aún en la nomenclatura apropiada para las células madre derivadas de tejido adiposo. Existen autores que siguen usando una nomenclatura diferente de la convencional años después de la recomendación de la IFATS, como Carelli *et al.*, (2014), que denomina a sus células madre como células madre derivadas de tejido adiposo humano, empleando el acrónimo hADSCs. Consideramos que el acrónimo otorgado por Carelli *et al.*, (2014), es más útil, pues hace que podamos diferenciar los acrónimos de las células madre “adultas” (ASCs) del acrónimo otorgado por la IFATS a las células madre de “tejido adiposo” (ASCs).

Todo lo descrito hasta el momento en este apartado hace referencia a células de origen humano. En lo referente a la adscripción de los mismos criterios para otras especies aún no existe consenso. La ISCT, en el artículo de Dominici *et al.*, (2006), deja entrever que los mismos criterios se podrían establecer para otras especies, aunque habría que establecer criterios complementarios para el fenotipado, ya que los antígenos de superficie de las células

de otras especies no comparten las mismas características que las humanas. Y esto a pesar de que algunos autores intentan mimetizar algunos de esos parámetros (Gala *et al.*, 2011).

### **1.2.2.1 Ventajas de las ADSCs frente a las células madre mesenquimales obtenidas de otros tejidos**

Tanto los humanos como los animales almacenan grasa subcutánea, ya sea como aumento del volumen celular de los adipocitos, ya sea como una expansión del número de adipocitos diferenciados (Gimble and Guilak, 2003). El fácil acceso al tejido adiposo subcutáneo, mediante liposucción, permite que se puedan obtener muestras bajo anestesia local y con un mínimo de molestias para el paciente. Si le sumamos a esto su alta abundancia y disponibilidad (Colter *et al.*, 2000; Goh *et al.*, 2007) y la ausencia de problemas éticos asociados a su uso, hace que este tejido sea una fuente importante para extraer células madre, como alternativa a la utilización de otros tipos de tejidos (Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006; Casteilla *et al.*, 2011). Otras ventajas importantes son que la cantidad de MSCs es 500 veces mayor en el tejido adiposo que en médula ósea (Fraser *et al.*, 2006), la facilidad de aprovisionamiento, una mayor frecuencia de las células madre, y una cinética más rápida para alcanzar el estado de confluencia mínimo durante el cultivo (Chen *et al.*, 2006; Fraser *et al.*, 2006; Schäffler and Büchler, 2007). Todo ello contribuye a que se puedan obtener un gran número de células sin necesidad de tener que expandirlas mediante cultivos, disminuyéndose así, el riesgo de aparición de senescencia inducida o anomalías cromosómicas *in vitro* (Tarte *et al.*, 2010). A estas ventajas hay que unirle el hecho de presentar el potencial de poder diferenciarse en hueso, cartílago, tendones, músculo esquelético y tejido adiposo cuando se cultiva bajo condiciones específicas de cada linaje (Zuk *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Gimble *et al.*, 2007; Schäffler and Büchler, 2007; Poloni *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015). También pueden diferenciarse hasta tejido endotelial y macrófagos (Charrière *et al.*, 2003). Sorprendentemente, las ADSCs no sólo tienen el potencial de diferenciarse en células y órganos de origen mesodérmico, sino que demuestran capacidad también para diferenciarse en neuronas, células endocrinas del páncreas, hepatocitos, células endoteliales y cardiomiocitos, pudiéndose explicar estas conversiones mediante los mecanismos de transdiferenciación (Schäffler and Büchler, 2007).

Factores como la edad del donante, el tipo de tejido adiposo (blanco o marrón), la localización (subcutánea o tejido adiposo visceral), el tipo de procedimiento quirúrgico de asilamiento, las condiciones de cultivo, la exposición al material plástico, la densidad celular

en placas, y los medios definidos pueden influir tanto en la velocidad de proliferación como en la capacidad de diferenciación de las ADSCs (Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006; Peptan *et al.*, 2006; Prunet-Marcassus *et al.*, 2006). La fracción vascular estromal (SVF) obtenida durante el protocolo de aislamiento de ADSCs, tanto en humanos como en otros mamíferos, se caracteriza por contener varias subpoblaciones de células madre mesenquimales. Se localizan progenitores subendoteliales (SP, también llamados pericitos o células murales) y células relacionadas como población transitoria de progenitores subendoteliales (SP-TP), y células estromales adiposas supra-adventiciales, (SA-ADSCs). También, hay células progenitoras endoteliales residentes en la pared vascular (VW-EPCs), progenitoras hematopoyéticas de la pared vascular (VW-HPCs) y células progenitoras de la grasa blanca (WFPCs) (Tallone *et al.*, 2011). Entre todas ellas existen diversas teorías sobre en cuáles de estas subpoblaciones reside realmente el nicho de MSCs. Por un lado hay autores que sugieren que las MSCs se encuentran en la capa íntima interna, y que son los pericitos de esa capa, las MSCs obtenidas de la SVF de tejido adiposo (Crisan *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2014). Es la conocida como la “teoría del pericito”. Otros suponen la localización de las MSCs en las zonas adventiciales (Lin *et al.*, 2010). Ambas teorías pueden ser concebibles, pues en vasos sanguíneos de pequeño diámetro las MSCs pueden tener su nicho en la zona de la capa íntima interna, y en los de mayor tamaño concentrarse en la zona adventicial (Díaz-Flores *et al.*, 2009; Tallone *et al.*, 2011).

### **I.2.3 Propiedades biológicas de las MSCs**

De todas las células madre comentadas hasta ahora las más versátiles, sin duda, son las embrionarias (ESCs) (Burns *et al.*, 2009). Estas células son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares adultos (Scheffler *et al.*, 2003). Sin embargo, su aplicación en clínica crea unas implicaciones éticas que provocan rechazo a la hora de su utilización, debido a la destrucción de embriones (Bajada *et al.*, 2008; Hipp and Atala, 2008) y porque representan un recurso alogénico, y, por lo tanto, el potencial de provocar una respuesta inmune (Hipp and Atala, 2008). Las iPSCs, por el contrario, no presentan este inconveniente. No obstante, se ha descrito que ambas poseen un elevado grado de tumorigénesis, especialmente por la formación de teratomas *in vivo* tras un trasplante de ESCs (Bajada *et al.*, 2008; Hipp and Atala, 2008; Teo and Vallier, 2010). Actualmente, la solución consiste en diferenciar las ESCs hasta las células objetivo *in vitro* y después trasplantarlas en el órgano o tejido diana (Carson *et al.*, 2006). Considerando estos inconvenientes, ha aumentado el interés por las MSCs que, si bien no conservan la potencialidad de las ESCs, no presentan las implicaciones éticas y el

elevado grado de proliferación. Dentro de las MSCs, las que actualmente tienen más impacto en la clínica son las ADSCs, debido a la disponibilidad y la facilidad con que se obtienen.

Se han postulado una serie de mecanismos a través de los cuales las ADSCs se pueden utilizar para reparar y regenerar los tejidos. En primer lugar, las ADSCs trasplantadas en un tejido dañado o enfermo pueden secretar citoquinas y factores de crecimiento que estimulan la recuperación de una manera paracrina (Cai *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2015; Ooi *et al.*, 2015). Las ADSCs podrían modular el "nicho de células madre" del huésped estimulando el reclutamiento de las células madre endógenas en un sitio determinado, y fomentando su diferenciación en el linaje requerido (Yagi *et al.*, 2010). Tampoco hay que olvidar el efecto protector antioxidante *per se* de las ADSCs. Y existen ya claros resultados por lo que se refiere a este efecto: sobre los fibroblastos de la piel, ante la agresión de la radiación UV de la luz solar (Kim *et al.*, 2008), frente a inductores de estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2009), o frente al daño inflamatorio por isquemia inducida (Chen *et al.*, 2011). Este potencial antioxidante se ha asignado a factores solubles segregados por las ADSCs (Kim *et al.*, 2008). Como resultado de ello, las sustancias tóxicas liberadas en el medio ambiente local se eliminarían, promoviendo así la recuperación de las células supervivientes (Park *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015a). Las ADSCs, además, son tolerogénicas, es decir, tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune. Asimismo, su capacidad antiinflamatoria puede jugar un papel importante en la reparación de tejidos dañados y en la actividad inmunorreguladora de estos tejidos (English and Mahon, 2011). Otro mecanismo propuesto es la posible diferenciación de las ADSCs a lo largo de un linaje deseado, antes de su trasplante alogénico o autólogo (Gimble *et al.*, 2007).

#### **I.2.4 Terapia celular con ADSCs**

La fracción vascular estromal (SVF) se ha empleado para diversos estudios clínicos y aplicaciones (Brown *et al.*, 2010), pero cada vez es mayor la tendencia de enriquecer la SVF o purificarla para obtener las ADSCs aisladas. La mayoría de los ensayos clínicos con ADSCs se han utilizado en tejidos degenerados después de un proceso inflamatorio no controlado. Las ADSCs expandidas son muy eficientes en el tratamiento de la enfermedad de Crohn (García-Olmo *et al.*, 2009b). Los ensayos sobre las fístulas indican que las ADSCs son muy eficientes en el control de la inflamación y mejoran el proceso de curación (García-Olmo *et al.*, 2008; Ebrahimian *et al.*, 2009; García-Olmo *et al.*, 2009a; García-Olmo *et al.*, 2015). Así, se pudo observar en un estudio aleatorizado de fase I y II con 25 pacientes con fístulas perianales

complejas, asociadas o no con la enfermedad de Crohn, y que fueron tratados con dosis de 20 millones de ADSCs y una segunda dosis de 40 millones, 8 semanas más tarde, que el 71% de los pacientes mostraba cicatrización de las fístulas en comparación con el 16% de pacientes tratados sólo con Cola de fibrina (García-Olmo *et al.*, 2008)

Otra enfermedad en la que se han usado las ADSCs es la esclerosis múltiple, debido a los efectos inmunosupresores de estas células (Le Blanc and Ringdén, 2007). Así, por ejemplo, en un modelo de roedores se demostró que las ADSCs inyectadas por vía intravenosa actúan suprimiendo la respuesta autoinmune en las primeras fases de la enfermedad, e induciendo la neuro-regeneración local en los animales con esclerosis múltiple (Constantin *et al.*, 2009). Las ADSCs también se han usado en ensayos clínicos para infarto de miocardio, para la fístula traqueomediastinal, defectos del hueso calvarial, úlceras en la piel y estrés inducido por incontinencia urinaria (Trounson *et al.*, 2011). En los trastornos cardiocirculatorios, obesidad y sus enfermedades asociadas, diabetes, o síndrome metabólico, entre otras, los adipocitos desempeñan un papel primordial en el desarrollo de estas patologías. Llegar a entender bien el origen, desarrollo, regulación, y la respuesta al estrés oxidativo de las ADSCs es una cuestión muy importante para la futura investigación clínica con ADSCs.

En general, comprobamos que en el campo de la Medicina Regenerativa las investigaciones y estudios preclínicos se dirigen hacia la corrección de defectos clínicos con el uso de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Actualmente existen 158 ensayos clínicos en todo el mundo con el uso de ADSCs, ó ASC (clinicaltrials.gov), implicados en cualquier tipo de patología (Tabla 1). En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos de los resultados obtenidos en ensayos clínicos que ya han concluido con resultados positivos. Pero el efecto beneficioso del uso de estas células en terapia celular no sólo lo observamos a través de ensayos clínicos, sino también en los diferentes experimentos llevados a cabo en modelos animales para el tratamiento de diversas patologías. En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos.

**Tabla 1. Distribución de los ensayos clínicos por grupos patológicos.**

ENFERMEDADES	Nº de Ensayos Clínicos
Aparato digestivo	12
Sistema cardiocirculatorio	29
Sistema nervioso	23
Sistema osteomuscular y tejido conectivo	24

Sistema respiratorio	3
Hematopoyéticos e inmunitarias	8
Neoplasias	15
Trastornos mentales y del comportamiento	4
Traumatismos	3

Tabla 2. Resultados de algunos ensayos clínicos realizados con ASC (ADSCs).

CONDICIÓN O PATOLOGÍA	TIPO Y VÍA DE TRANSPLANTACIÓN	RESULTADOS	REFERENCIA
Esclerodermia lineal en “coup de sabre”	Autólogo. Lipoinyección facial en combinación con ASCs.	Mejora del aspecto.	(Karaaltin <i>et al.</i> , 2012).
Lipoatrofia facial	Autólogo. Lipoinyección tópica en combinación con ASCs	No hay diferencias estadísticas significativas entre el registro de mejora clínica comparado con lipoinyección convencional.	(Yoshimura <i>et al.</i> , 2008)
Reconstrucción de mama	Autólogo. Lipoinyección tópica combinadas con ASCs.	Mejora del injerto de grasa con retención de volumen	(Yoshimura <i>et al.</i> , 2010)
Síndrome de Treacher Collins	Autólogo. Se utilizó aloinjerto de hueso esculpido, ASCs BMP-2 e injerto perióstico.	El registro CT demostró la reconstrucción completa del hueso de los cigomas bilaterales.	(Taylor, 2010)
Defecto de la expansión calvaria	Autólogo. Inyección local asociada a cola de fibrina.	Formación de hueso nuevo y aproximación a calvaria continua, tres meses después de la reconstrucción	(Lendeckel <i>et al.</i> , 2004)
Defecto de calvaria a gran escala	Autólogo. Implantación de ASCs envueltas en estructura $\beta$ -TCP.	Sin complicaciones y resultado satisfactorio de osificación	(Thesleff <i>et al.</i> , 2011)
Hemi-maxillectomía debida a queratoquiste a gran escala	Autólogo. Implantación de piezas de titanio rellenas de ASCs, $\beta$ -TCP y BMP-2	Integración ósea del implante sin efectos adversos	(Mesimäki <i>et al.</i> , 2009)
Osteonecrosis de la cabeza femoral	Autólogo. Inyección local	Regeneración de tejido	(Pak, 2012)

	de ASCs con plasma rico en ácido hialurónico y plaquetas activadas por cloruro de calcio.	medular óseo y reducción a largo plazo del dolor de cadera	
Defecto persistente del epitelio corneal esterilizado	Autólogo. Inyección tópica.	Curación completa del epitelio corneal después de 1 mes desde el trasplante	(Agorogiannis <i>et al.</i> , 2012)
Fístulas crónicas en enfermedad de Crohn	Inyección en pared de la vía, asociada a fibrina, en fístulas enterocutánea. Inyección en la mucosa rectal de fístulas recto-vaginales y perianales	La proporción de pacientes que mejoraron la curación de fístulas fue significativamente mayor en los tratados con ASCs que con cola de fibrina sin más.	(García-Olmo <i>et al.</i> , 2009a)

**Tabla 3. Terapia celular con ADSCs en modelos animales.**

CONDICIÓN O PATOLOGÍA	ESPECIES	VIA Y TIPO DE TRASPLANTE	RESULTADOS	REFERENCIA
Defecto crítico de calvaria	Rata inmunodeprimida	ASC humanos osteo-inducidos en estructura PLGA se implantaron en el sólido. Xenogénico	Capacidad de regeneración ósea en el defecto de tamaño crítico del esqueleto	(Yoon <i>et al.</i> , 2007)
Defecto femoral	Rata inmunodeprimida	BMP-2 de hASC genéticamente modificados se implantaron en el defecto femoral. Xenogénico	Inducción de la formación del hueso <i>in vivo</i> , y curación del defecto crítico del tamaño femoral	(Peterson <i>et al.</i> , 2005)
Infarto de miocardio	Rata inmunodeprimida	ASCs humanos fueron inyectados intramiocardialmente. Xenogénico	Las ASCs humanas preservaron la función cardíaca, aumentaron la angiogénesis local y las ramificaciones del nervio cardíaco.	(Cai <i>et al.</i> , 2009)
Infarto de miocardio	Rata Lewis	Intramiocardial. Autólogo	Mejora de la función cardíaca de ratas infartadas.	(Wang <i>et al.</i> , 2009)

Infarto de miocardio	Rata Lewis	Inyección de GFP-ASCs de rata en la cámara del ventrículo izquierdo (LV). Alogénico	La dimensión al final de la diástole en LV tuvo una dilatación menor, y la función cardíaca y de eyección mejoraron significativamente.	(Schenke-Layland <i>et al.</i> , 2009)
Isquemia cerebral	Rata	Inyección intracerebral de ASCs neurales inducidas de ratas. Alogénico	Recuperación funcional y reducción de la atrofia hemisférica	(Yang <i>et al.</i> , 2011)
Daño del nervio ciático	Ratas Sprague-Dawley	ASCs diferenciadas a células de Schwann se implantaron en la terminación nerviosa. Alogénico	Aumento significativo de la regeneración del nervio.	(di Summa <i>et al.</i> , 2010)
Daño en médula espinal	Rata	Inyección en el sitio del daño. Alogénico	Recuperación significativa de la disfunción de las extremidades traseras. Los factores neurotróficos promovieron la recuperación funcional.	(Ohta <i>et al.</i> , 2008)
Daño hepático y hepatectomía parcial	Ratas Sprague-Dawley	Las células se inyectaron vía vena porta hepática, o por la vena dorsal del pene. Alogénico	Las células disminuyeron las enzimas del suero hepático como la alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa y mejoró la albúmina sérica y la función del hígado.	(Liang <i>et al.</i> , 2009)

A pesar de los ensayos clínicos aquí descritos, las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSCs) han sido más extensamente estudiadas. Sin embargo, las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) no han sido totalmente caracterizadas, y sus propiedades tampoco han sido aún totalmente reconocidas. Para prolongar la vida media de las ADSCs sería necesario evaluar su estabilidad y funcionalidad. Por ello debemos entender cuáles son sus comportamientos moleculares y cómo responden a cambios fisiológicos y patológicos.

### **I.3 RUTAS BIOQUÍMICAS IMPLICADAS EN EL ESTADO DE POTENCIALIDAD Y SUS MECANISMOS DE AUTO-RENOVACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE**

La capacidad de auto-renovación es esencial para que las células madre puedan ampliar su número durante el desarrollo, manteniéndose dentro de los tejidos adultos y restaurando el “pool” de células madre después de una lesión, ya que defectos en los mecanismos de auto-renovación podrían conducir a defectos durante el desarrollo, como envejecimiento prematuro y cáncer. Aunque la división celular es un proceso de proliferación más general, que incorpora todo tipo de divisiones, la auto-renovación requiere que, al menos, una de las células hija tenga potencial similar a la célula madre progenitora. Para la mayoría de las células madre de mamíferos, tales como las HSCs o las células madre neuronales (NSCs), la auto-renovación es la división con mantenimiento de la multipotencialidad. Algunos de los mecanismos implicados que regulan ampliamente la proliferación están preferentemente regulando la auto-renovación (Molofsky *et al.*, 2003; Nishino *et al.*, 2008). Aunque las células madre tienen un amplio potencial de auto-renovación, esto no significa necesariamente que se renueven ampliamente en condiciones fisiológicas. La mayoría se encuentran en reposo la mayor parte del tiempo y sólo pueden experimentar un número limitado de divisiones (Kiel *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2008; Foudi *et al.*, 2009). Las ESCs poseen un potencial de auto-renovación indefinido, conferido por la regulación de factores de transcripción y un único ciclo celular (Jaenisch and Young, 2008) (Figura 1). En estas células madre Sox2 coopera con Oct4 para activar la expresión de un número de genes que regulan la pluripotencialidad, incluyendo Oct4 y Nanog (Masui *et al.*, 2007).

La proteína Nanog (que significa “tierra siempre joven” en la antigua lengua celta) también es requerida para el mantenimiento de la pluripotencialidad, pues en ESCs de ratones deficientes en Nanog son propensas a la diferenciación espontánea (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003). Chambers *et al.* (2003), demuestran que las células embrionarias deficientes en Nanog poseen aún capacidad de auto-renovarse, pero son más propensas a la diferenciación. Por otra parte, esta proteína es capaz de unirse a NFκB, lo que conduce a la inhibición de las actividades pro-diferenciación y bloquean Smad1, inhibiendo la diferenciación inducida por BMP y manteniendo, en consecuencia, la pluripotencialidad (Suzuki *et al.*, 2006; Torres and Watt, 2008). Estos factores forman el núcleo de un circuito regulador que promueve la expresión de genes que mantienen la pluripotencialidad, a la vez que inducen la represión de genes que promueven la diferenciación. La red Oct4-Sox2-Nanog

necesita estar ajustada por regulación positiva y negativa, debido a que una ligera hiper- o hipoactivación de alguno de estos factores pueden interrumpir el estado de pluripotencialidad (Niwa *et al.*, 2000). Oct4, Sox2 y Nanog regulan su propia expresión, así como la expresión de uno al otro, formando un circuito de realimentación positiva (Figura 1). Otro factor de

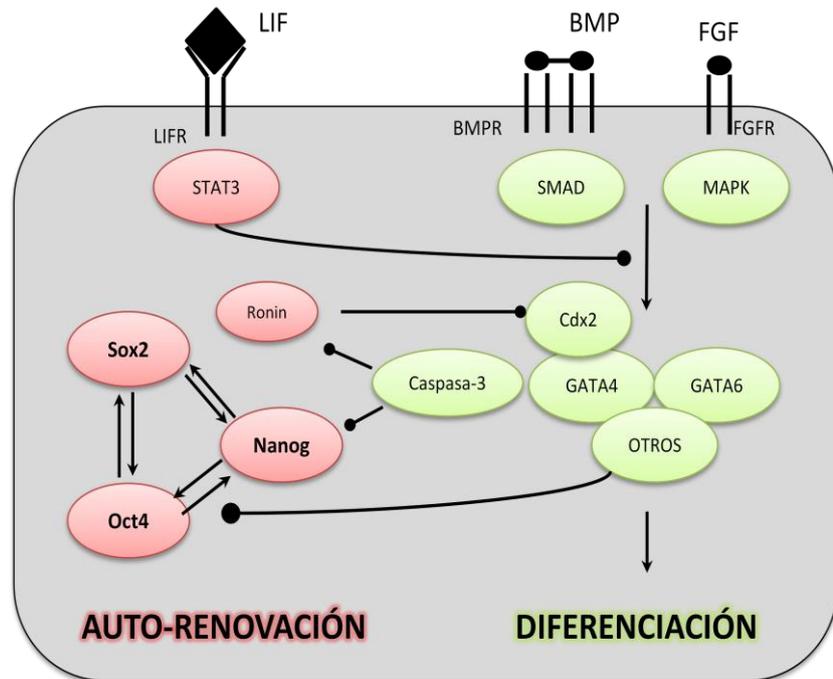


Figura 1. Mecanismos de regulación de la pluripotencialidad en células embrionarias.

(Figura 1). Otro factor de

transcripción crítico es la proteína Ronin, que suprime la diferenciación de células embrionarias mediante la unión directa y la supresión de la transcripción de los genes que inducen la diferenciación, incluyendo GATA4 y GATA6. Tras la inducción de la diferenciación, Ronin (Dejosez *et al.*, 2008) y Nanog (Fujita *et al.*, 2008) son inactivadas por proteólisis mediante la acción de la caspasa-3, permitiendo de este modo la activación de los procesos de diferenciación.

Sin embargo, existen otras proteínas que interactúan con los factores de pluripotencialidad, pudiendo alterar los mecanismos de auto-renovación. Se ha demostrado que SIRT1 interviene en la desacetilación de Sox2, contribuyendo a mantener la actividad de ese factor de transcripción en el núcleo y permitiendo retrasar la senescencia celular durante los pasajes celulares prolongados (Yuan *et al.*, 2012). Empleando ARN de interferencia para SIRT1 se induce la acetilación de Sox2, promoviendo la exportación nuclear y la ubiquitinización de Sox2, lo que conlleva su degradación en el proteosoma (Yoon *et al.*, 2014). La activación de SIRT1 por el resveratrol puede revertir estos efectos mejorando la capacidad de formación de colonias y aumentando el potencial de diferenciación en los linajes osteogénicos y adipogénicos, de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, la expresión SIRT1 disminuye durante los procesos de diferenciación (Shakibaei *et al.*, 2012;

Simic *et al.*, 2013). Sobre la base de estos descubrimientos, parece entreverse que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la troncalidad de las MSCs.

En contraste con las células madre embrionarias, las células madre adultas poseen un estimable aunque limitado, potencial de auto-renovación. Parece requerirse un conjunto de programas de auto-renovación específica para cada tejido que permiten un control más elaborado del ciclo celular. En muchos casos, estos programas deben perpetuar las células madre durante toda la vida, en respuesta a cambios en el desarrollo y/o a la regeneración de los tejidos en eventos fisiológicos futuros. Por todo ello necesitarán de mecanismos que les confieran la posibilidad de retener períodos repetidos de quiescencia y de reentrada en el ciclo celular. Son circunstancias distintas al ámbito de la embrionarias y, por tanto, se requerirá de una regulación más compleja del ciclo celular, con mecanismos adicionales de control y de regulación que las células embrionarias (He *et al.*, 2009). La mayoría de las células madre adultas habitan microambientes especializados, conocidos como nichos (Morrison and Spradling, 2008). Estos nichos promueven el mantenimiento y regulan la función de diferentes acciones, como proporcionar un sitio de anclaje y producir señales que regulan la supervivencia celular, estado del ciclo celular, y la diferenciación. Pero su principal objetivo es mantener las células madre indiferenciadas. Por razones desconocidas, muchas células madre requieren períodos intermitentes de quiescencia para su mantenimiento. La quiescencia depende de una serie de factores extrínsecos, cuya pérdida de señalización conduce a un aumento de la proliferación y agotamiento de dichas células (Kobielak *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009).

#### **I.4 RUTAS BIOQUÍMICAS IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACION DE LAS CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES (MSCs)**

Trabajar con cultivos primarios de células precursoras SVF del tejido adiposo resulta más ventajoso que hacerlo a través de líneas celulares de adipocitos. Sin embargo, los estudios de las rutas bioquímicas implicadas en la diferenciación de las MSCs han sido llevadas a cabo mayoritariamente no con cultivos primarios, sino con líneas celulares, tales como C3H10T1/2 para la osteogénesis (Jackson *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2013) y MC3T3-E1 (Sudo *et al.*, 1983), y 3T3-L1 para la adipogénesis, extrapolando luego los resultados a las MSCs. Esto se debe a que las MSCs pueden ser dependientes del donante, el aislamiento y las técnicas de cultivo. Debido a estas contingencias puede que no

representen genuinamente a la verdadera población. Además, las MSCs usualmente han derivado de la médula ósea. Sin embargo, se han aislado de muchos otros tejidos estromales adultos, como tejido adiposo, cordón umbilical y periostio, lo que puede conllevar a que esas células tengan programados otros patrones de diferenciación.

Las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse principalmente en osteoblastos, adipocitos y condrocitos, y existen varios métodos para imitar los procesos de diferenciación *in vitro*. Los osteoblastos se desarrollan a través de una serie de fases, iniciadas por la proliferación celular, seguido de la maduración de la matriz extracelular y la mineralización de esta matriz. Estos cambios en la actividad celular se correlacionan con un patrón de maduración de las células osteoprogenitoras, que finalmente se diferencian en preosteoblastos y osteoblastos. Este proceso de maduración de las células puede ser inducido *in vitro* por la adición de proteínas BMP, a menudo BMP-2 (Banerjee *et al.*, 2001), o la adición de un cóctel de diferenciación constituido por dexametasona, ascorbato y  $\beta$ -glicerofosfato (Jaiswal *et al.*, 1997).

Al igual que sucede con los osteoblastos, los adipocitos maduros tienen que pasar a través de una serie de estadios celulares previos antes de convertirse en adipocitos diferenciados, que expresan marcadores específicos de adipocitos FABP4 y 5 (Samulin *et al.*, 2008), conteniendo vesículas lipídicas. La adipogénesis *in vitro* puede ser inducida también por la adición de un cóctel de diferenciación, una mezcla de dexametasona, isobutimetilxantina (IBMX), indometacina e insulina.

Se han desarrollado métodos para inducir el proceso de condrogénesis *in vitro*. La diferenciación condrogénica *in vivo* requiere de una condensación inicial de las MSCs, que es imitado *in vitro* mediante el cultivo de las células en esfera. La diferenciación condrogénica puede entonces ser inducida a través de la presencia de factores de crecimiento, como TGF- $\beta$ , resultando la aparición de un fenotipo caracterizado por la regulación positiva de moléculas específicas de cartílago, como colágeno de tipo II y IX, agregano, versicano, biglicano y decorina (Peltari *et al.*, 2008).

#### **I.4.1 Factores implicados en la osteogénesis**

Se conocen diversos factores implicados en la regulación de la osteogénesis, pero dos de los más ampliamente estudiados son Runx2 (Cbfa1) y Osterix (Marie, 2008). Runx2 se considera el principal factor de transcripción que controla la diferenciación a osteoblastos. Fue identificado como un factor de transcripción importante en la osteogénesis de la línea

celular MC3T3-E1, ocasionando la transcripción de osteocalcina, genes específicos de osteoblastos y de colágeno 1A1. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Runx2 puede inducir la osteogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo*, aumentando los marcadores osteoblásticos, como osteopontina, osteocalcina, fosfatasa alcalina (ALP) y la mineralización *in vitro*, mientras que *in vivo* aceleraba la curación de defectos en el cráneo (Zheng *et al.*, 2004). A la inversa, ratones deficientes en Runx2 mostraron una ausencia completa de osificación, debido a una falta de maduración en los osteoblastos (Komori *et al.*, 1997). Runx2 también se encuentra implicado en la trans-diferenciación de preadipocitos en osteoblastos. Takahashi (2011), demostró que la sobreexpresión de Runx2 en la línea celular de preadipocitos 3T3-E1 provocó una disminución de los marcadores adipocíticos PPAR $\gamma$ 2 y C/EBP $\alpha$ , y un aumento en los marcadores osteogénicos tales como ALP, osteocalcina y sialoproteína ósea (BSP). Osterix (OSX) es otro importante factor de transcripción implicado en la diferenciación, pero parece estar supeditado a Runx2. Actúa ya avanzada la cadena de señalización intracelular, ya que OSX no se expresa en ratones deficientes en Runx2, sin embargo, la expresión de Runx2 sí permanece en ratones deficientes en OSX (Nakashima *et al.*, 2002).

#### **I.4.2 Factores implicados en la adipogénesis**

El principal inductor de la adipogénesis es el receptor hormonal nuclear PPAR $\gamma$ . Existen dos isoformas, PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2. Ambas se expresan de forma ubicua, pero PPAR $\gamma$ 2 se encuentra principalmente en tejido adiposo, siendo un estimulador más potente de la adipogénesis que PPAR $\gamma$ 1 (Müeller *et al.*, 2002). La delección de PPAR $\gamma$  en fibroblastos conduce a una reducción de la adipogénesis (<2% de eficiencia), incluso con la adición de C/EBP $\alpha$ , otro regulador de la adipogénesis (Rosen *et al.*, 2002). Estos resultados y otros sugieren que PPAR $\gamma$  es, a la vez, suficiente e indispensable para la diferenciación adipogénica. Pero aunque sea ampliamente considerado como el principal regulador de la adipogénesis, interviene también en la regulación recíproca de adipogénesis y osteogénesis (Akune *et al.*, 2004) (Figura 2).

Existe otro factor de transcripción, que funcionan como homo- o heterodímeros con otros miembros de la familia C/EBP. De los tres compuestos, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ , C/EBP $\alpha$  es el que tiene el papel más prominente, ya que su sobreexpresión en fibroblastos induce la adipogénesis en un 50% de las células (Freytag *et al.*, 1994), y el bloqueo del mRNA reduce el fenotipo adiposo en células 3T3-L1 (Lin and Lane, 1992). Otro posible factor de transcripción implicado en la adipogénesis es SREBP1, cuya sobreexpresión en la línea NIH-3T3 produce un aumento sinérgico con la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  en la adipogénesis, lo que sugiere su implicación en esta vía (Kim and Spiegelman, 1996).

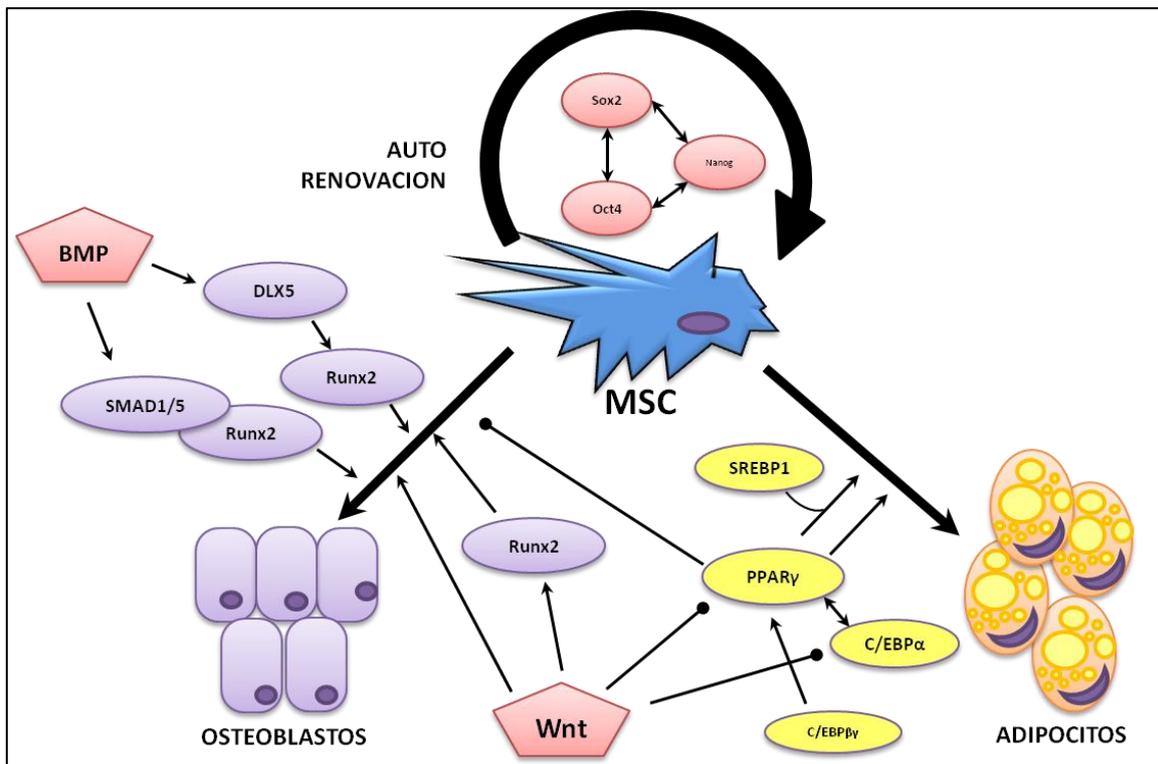


Figura 2. Mecanismos de diferenciación a Osteoblastos/Adipocitos.

### I.4.3 Factores implicados en la condrogénesis

Al igual que con la adipogénesis y la osteogénesis, existe un regulador clave de la condrogénesis, Sox9. Se sabe porque la supresión de la expresión de Sox9 en las células mesenquimales conduce a la completa ausencia de las condensaciones condrogénicas en las extremidades durante el desarrollo (Akiyama *et al.*, 2002). Otros dos miembros de la familia de factores de transcripción Sox, que también juegan un papel en la condrogénesis, son L-Sox5 y Sox6, no desarrollándose condrogénesis cuando se inactivan estos genes (Smits *et al.*, 2001). Como se mencionó anteriormente, Runx2 es un regulador clave de la osteogénesis, pero también tiene un papel importante en la regulación de la condrogénesis. Se observó que los ratones deficientes en Runx2 presentaban defectos en el cartílago, así como otros defectos óseos propios de la inhibición de Runx2 (Kim *et al.*, 1999).

### I.4.4 Vías de señalización para el control de la diferenciación osteogénica y adipogénica

Se han encontrado múltiples vías de señalización involucradas en determinar el linaje que tendrán las MSCs a la hora de diferenciarse y, por tanto, cuál será su destino (osteoblasto, adipocito o condrocito). Algunos estudios han identificado la implicación de las siguientes vías de señalización para el control de la diferenciación: proteínas morfogenéticas óseas (BMP), Hedgehog (Hh) y, principalmente, la señalización Wnt (Yamaguchi *et al.*, 2000; Shimoyama *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2011; Baron and Kneissel, 2013).

La señalización Wnt ha sido ampliamente estudiada por jugar un papel importante en la regulación de la función del esqueleto y, en particular, la diferenciación y la actividad de los osteoblastos. Regula diferentes procesos, incluyendo el desarrollo, la proliferación y el destino celular mediante diferentes moléculas de la familia Wnt (Ling *et al.*, 2009; Baron and Kneissel, 2013). La señalización Wnt actúa a través de dos vías conocidas (Figura 4), una llamada vía canónica, en la cual está implicada la proteína  $\beta$ -catenina, y la vía no canónica que es independiente de  $\beta$ -catenina.

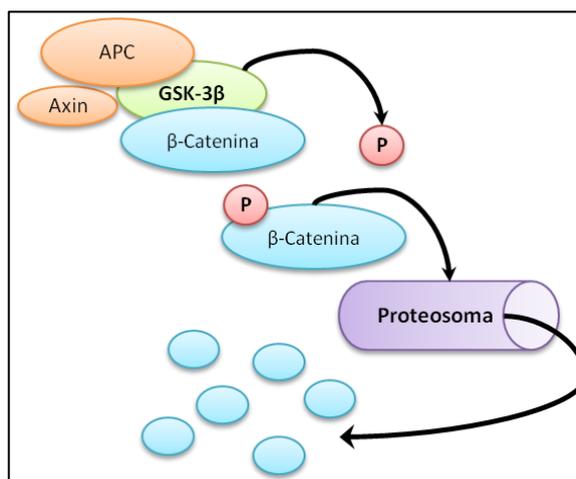


Figura 3. Proceso de degradación de  $\beta$ -Catenina por GSK-3 $\beta$ .

En la vía canónica, los ligandos Wnt se unen a sus receptores “frizzled” (Fzd) y co-receptores LRP5/6 (receptor de lipoproteínas de baja densidad) provocando la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), enzima encargada de fosforilar a  $\beta$ -catenina para que se degrade en el proteosoma (Figura 3). Por tanto, si GSK3 $\beta$  es inhibida,  $\beta$ -catenina no está fosforilada, se produce una translocación nuclear de ésta induciendo la transcripción de genes de la familia LEF/TCF que promoverán la osteoblastogénesis (Figura 4).

Se han llevado a cabo varios estudios usando distintos activadores e inhibidores de la vía de señalización Wnt, tanto *in vivo* como *in vitro*. Un proceso por el cual la señalización de Wnt puede actuar para aumentar la formación de hueso es a través de la estimulación del desarrollo de osteoblastos. La inhibición de la actividad de la enzima GSK3 $\beta$  usando LiCl o pequeñas moléculas, origina un aumento de  $\beta$ -catenina, y su posterior translocación nuclear, estimulando a las MSCs de ratón para diferenciarse a osteoblastos (Jackson *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2006).

La osteoblastogénesis se estimula con la presencia de Wnt3a, Wnt1, Wnt10 (Bennett *et al.*, 2007) y  $\beta$ -catenina, y se inhibe con Dkk1 (Krishnan *et al.*, 2006). Además de esto, trabajos *in vivo* han demostrado que la administración de LiCl a ratones C57BL/6, durante 4 semanas, aumenta dramáticamente la formación ósea (Clément-Lacroix *et al.*, 2005). Sin embargo, hay que tener en cuenta que a través de la vía Wnt no canónica, las moléculas Wnt promueven la osteogénesis a través de la estimulación directa de la expresión Runx2 vía JNK (Gaur *et al.*, 2005; Baron and Kneissel, 2013) (Figura 4).

La vía de señalización Wnt también se encuentra relacionada con la diferenciación adipogénica. Múltiples estudios muestran una reducida adipogénesis cuando existe una activación de la vía Wnt canónica (Prestwich and Macdougald, 2007), tanto *in vivo* como *in vitro*. Tras la estimulación, la adipogénesis de las células 3T3-L1 es completamente nula. Sin embargo, la activación no afecta a la expresión de los factores de transcripción de los adipocitos C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ , pero sí que inhibe a C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Bennett *et al.*, 2002) (Figura 2). Por el contrario, inhibidores que reducen las moléculas Wnt endógenas provocan diferenciación adipogénica espontánea de pre-adipocitos.

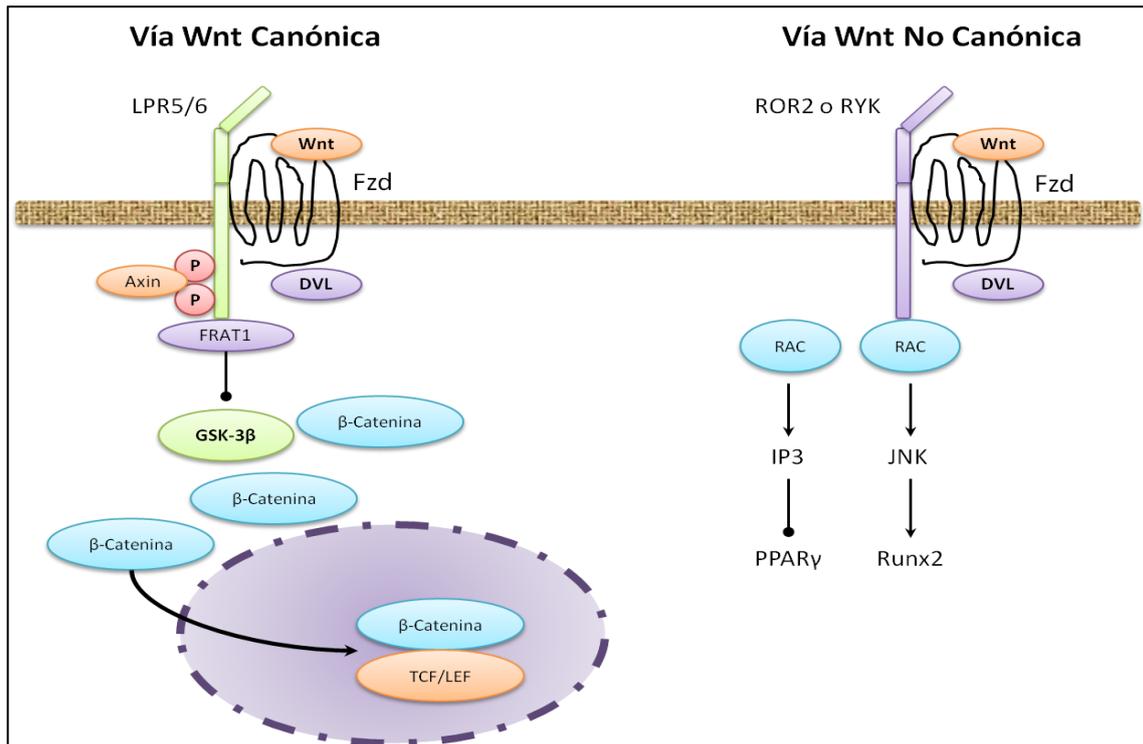


Figura 4. Vías de Señalización Wnt

### I.4.5 Implicación del Factor de Transcripción Sox2 en el control de la diferenciación osteogénica y adipogénica en MSCs

Como hemos visto anteriormente, los linajes osteoblásticos y adipocíticos tienen destinos alternativos, es decir un aumento de la adipogénesis se correlaciona con una disminución de la osteogénesis durante el desarrollo y envejecimiento (Takada *et al.*, 2009; Urs *et al.*, 2010). De hecho, se produce osteopenia y aumenta la obesidad central con la edad. Y uno de los factores de factor de transcripción que se requiere para mantener la auto-renovación y el estado indiferenciado es Sox2 (Basu-Roy *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012).

La expresión de Sox2 se encuentra disminuida cuando se produce la diferenciación osteoblástica y su expresión constitutiva impide la diferenciación osteoblástica mediante la inducción de genes relacionados con el estado de quiescencia y la inhibición de la vía Wnt (Mansukhani *et al.*, 2005; Holmes *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011). Sox2, a su vez, se encuentra relacionado con otra vía de señalización que aún no hemos mencionado. Se trata de la vía de señalización Hippo, y su efector clave es la proteína YAP1, vía que controla la proliferación celular y el tamaño del órgano (Pan, 2010; Halder and Johnson, 2011; Zhang, 2015). YAP1 es un coactivador transcripcional que mantiene la pluripotencialidad de las células embrionarias, donde actúa como un coactivador de los factores de transcripción TEAD para regular varios

genes implicados en la pluripotencialidad (Lian *et al.*, 2010). La actividad transcripcional de YAP1 está restringida por fosforilación.

Cuando la vía Hippo está activa, YAP1 y TAZ se fosforilan y quedan secuestrados en el citoplasma, lo que inhibe su actividad transcripcional (Pan, 2007; Zhao *et al.*, 2011a). La inactivación de la vía Hippo conduce a aumentos en la localización nuclear y la actividad transcripcional de TEAD mediada por YAP1 y TAZ (Zhao *et al.*, 2007; Ota and Sasaki, 2008). TAZ se identifica como un factor que se une y activa Runx2, al mismo tiempo que inactiva PPAR $\gamma$  (Hong *et al.*, 2005); mientras que YAP1 inhibe la función RUNX2 secuestrando su actividad transcripcional (Zaidi *et al.*, 2004) y, a diferencia TAZ, YAP1 no se une a PPAR $\gamma$  (Hong *et al.*, 2005). Sox2 mantiene la auto-renovación allí donde su expresión constitutiva inhibe la diferenciación osteogénica, mediante el mantenimiento de una expresión genética de quiescencia a través de una regulación a la baja de la señalización Wnt/  $\beta$ -catenina (Seo *et al.*, 2011). Por lo tanto, la inducción de la adipogénesis requiere niveles moderados de expresión YAP1, que actúa como si fuera un reostato para regular el destino de las MSCs.

Si existen niveles bajos tanto de Sox2 como de YAP1 se impide la diferenciación adipogénica y la inducción de PPAR $\gamma$ . Sin embargo, la sobreexpresión de Sox2 puede compensar la disminución de YAP1 y permitir así la adipogénesis, lo que sugiere que Sox2 y YAP1 podrían tener funciones que se superponen en este proceso (Seo *et al.*, 2013). YAP1, al igual que Sox2, bloquea la diferenciación osteogénica y antagoniza la vía de señalización Wnt mediante la unión con  $\beta$ -catenina y la inducción de un regulador negativo de la vía Wnt, la proteína Dkk1. Aunque Sox2 también puede inducir directamente la expresión Dkk1 (Park *et al.*, 2012), lo que hace pensar que Dkk1 está sinérgicamente regulada por Sox2 y YAP1. Parece claro que Sox2 regula el destino “osteo-adipo” en MSCs y que lo hace, por lo menos en parte, favoreciendo la adipogénesis mediante la regulación de la expresión de YAP1, un efector transcripcional que está restringido por la vía de Hippo (Seo *et al.*, 2013). Sin embargo, otros autores afirman que Sox2 es un potente inhibidor tanto de la diferenciación adipogénica como osteogénica (Schönitzer *et al.*, 2014).

#### **I.4.6 Implicación de SIRT1 y AMPK en la diferenciación de MSCs**

Existen otras proteínas que aunque no pertenezcan claramente a una determinada vía, por su funcionalidad en la célula pueden intervenir en diferentes procesos como puede ser la diferenciación. Una de ellas es SIRT1 (Cohen-Kfir *et al.*, 2011; Shakibaei *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012) cuyos niveles disminuyen cuando las MSCs se diferencian (Shakibaei *et al.*,

2012; Simic *et al.*, 2013). SIRT1 se correlaciona negativamente con la adipogénesis en preadipocitos. Teniendo en cuenta que los adipocitos se diferencian a partir de MSCs, la diferenciación puede estar influenciada por SIRT1. De hecho, el nivel de proteína SIRT1 disminuye en MSCs con cada pase durante el cultivo (Yuan *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013) y la actividad de SIRT1 disminuye con la edad (Li *et al.*, 2011), y preconiza obesidad. La activación de SIRT1 *in vitro* podría alterar el destino de la diferenciación de las MSCs, promoviendo la diferenciación osteogénica frente a la adipogénica (Li *et al.*, 2011; Tseng *et al.*, 2011; Peltz *et al.*, 2012; Shakibaei *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012). En un modelo de ratón SIRT1<sup>+/-</sup>, la formación de huesos disminuye y la adipogénesis aumenta, resultando una reducción evidente de la masa ósea, lo que indica que la acción de SIRT1 *in vivo* está en línea con su efecto *in vitro* (Zhang *et al.*, 2010). Se demostró igualmente una reducción de la diferenciación hacia osteoblastos y condrocitos *in vitro* (Simic *et al.*, 2013). Parte de la intervención de SIRT1 en los procesos de diferenciación puede deberse a su capacidad desacetiladora, actuando sobre Runx2 (Shakibaei *et al.*, 2012) y  $\beta$ -catenina (Gaur *et al.*, 2005). Aunque parece ser que PPAR $\gamma$  también podría ser desacetilado por SIRT1 (Han *et al.*, 2010). Un estudio reciente sugiere que la desacetilación por SIRT1 de PPAR $\gamma$  en Lys293 y Lys268 induce la formación de tejido adiposo marrón (Qiang *et al.*, 2012).

Un activador indirecto de SIRT1 es el resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) (Pacholec *et al.*, 2010) que es capaz de promover o inhibir tanto la diferenciación osteogénica como la diferenciación adipogénica dependiendo de la dosis y el tiempo. Esto es, resveratrol inhibe la diferenciación adipogénica a una dosis alta (10 mM), durante la exposición a corto plazo; pero mejora el potencial adipogénico a una dosis baja (0,1-5 mM) cuando las células

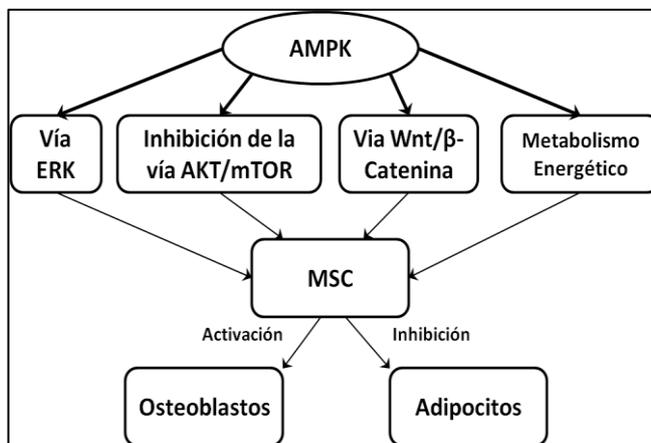


Figura 5. Mecanismos por los cuales AMPK $\alpha$  interviene en la diferenciación de las MSCs.

son expuestas durante períodos más largos de tiempo (Peltz *et al.*, 2012). Aunque hay autores que sugieren que la activación de SIRT1 por resveratrol mejora tanto el potencial osteogénico como adipogénico debido a su capacidad de auto-renovación (Yoon *et al.*, 2014). Otra proteína que parece estar implicada en la promoción de la diferenciación osteogénica y supresión de la diferenciación adipogénica es AMPK $\alpha$  (Kanazawa *et al.*, 2009; Lin *et al.*,

2010; Vingtdoux *et al.*, 2011). Existen diferentes procesos en los que AMPK $\alpha$  está implicada, como es el caso de irradiar ADSCs con rayos ultravioleta-A inhibiendo la diferenciación a adipocitos (Lee *et al.*, 2010). Otra prueba directa de la implicación de AMPK $\alpha$  es que usando el compuesto C, un inhibidor de AMPK $\alpha$ , se promueve la formación de lípidos, como consecuencia de una activación de genes específicos adipogénicos, y una disminución en la deposición de matriz mineralizada, por inhibición de genes específicos osteogénicas, todo esto durante la diferenciación de MSCs en medio adipogénico u osteogénico, respectivamente (Kim *et al.*, 2012), lo que indica que AMPK $\alpha$  favorece la diferenciación osteogénica a expensas de la diferenciación adipogénica.

Varias vías de señalización podrían estar involucradas en la diferenciación de las MSCs por AMPK $\alpha$  (Figura 5). Sin embargo, no se sabe cómo AMPK $\alpha$  interactúa con estas vías, y cómo interactúan entre sí para ejercer sus funciones de diferenciación. Una de tales vías de señalización es a través de ERK. Su activación podría favorecer la diferenciación de las MSCs hacia el linaje osteogénico a expensas de linaje adipogénico (Jaiswal *et al.*, 2000). Además, AMPK $\alpha$  podría regular la diferenciación osteogénica a través de la inhibición de la vía mTOR (Pantovic *et al.*, 2013). Incluso, parece que también podría regular la transcripción de  $\beta$ -catenina (Zhao *et al.*, 2011b). Sin embargo, SIRT1 y AMPK $\alpha$  no actúan de manera independiente, sino que interactúan entre sí en

los procesos de diferenciación. La actividad de la AMPK podría estar regulada por LKB1, CaMKK $\beta$  y TAK1 que, a su vez, podrían estar moduladas por SIRT1, (Carling *et al.*, 2008; Herrero-Martín *et al.*, 2009). Durante la diferenciación, SIRT1 desacetilaría LKB1 mientras que AMPK $\alpha$  regularía positivamente la expresión y la actividad Nampt, enzima necesaria para que SIRT1 ejerza su actividad desacetilasa (Cantó *et al.*, 2009) (Figura 6).

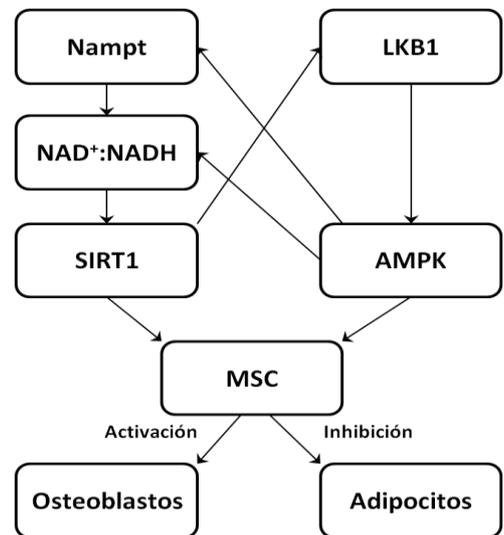
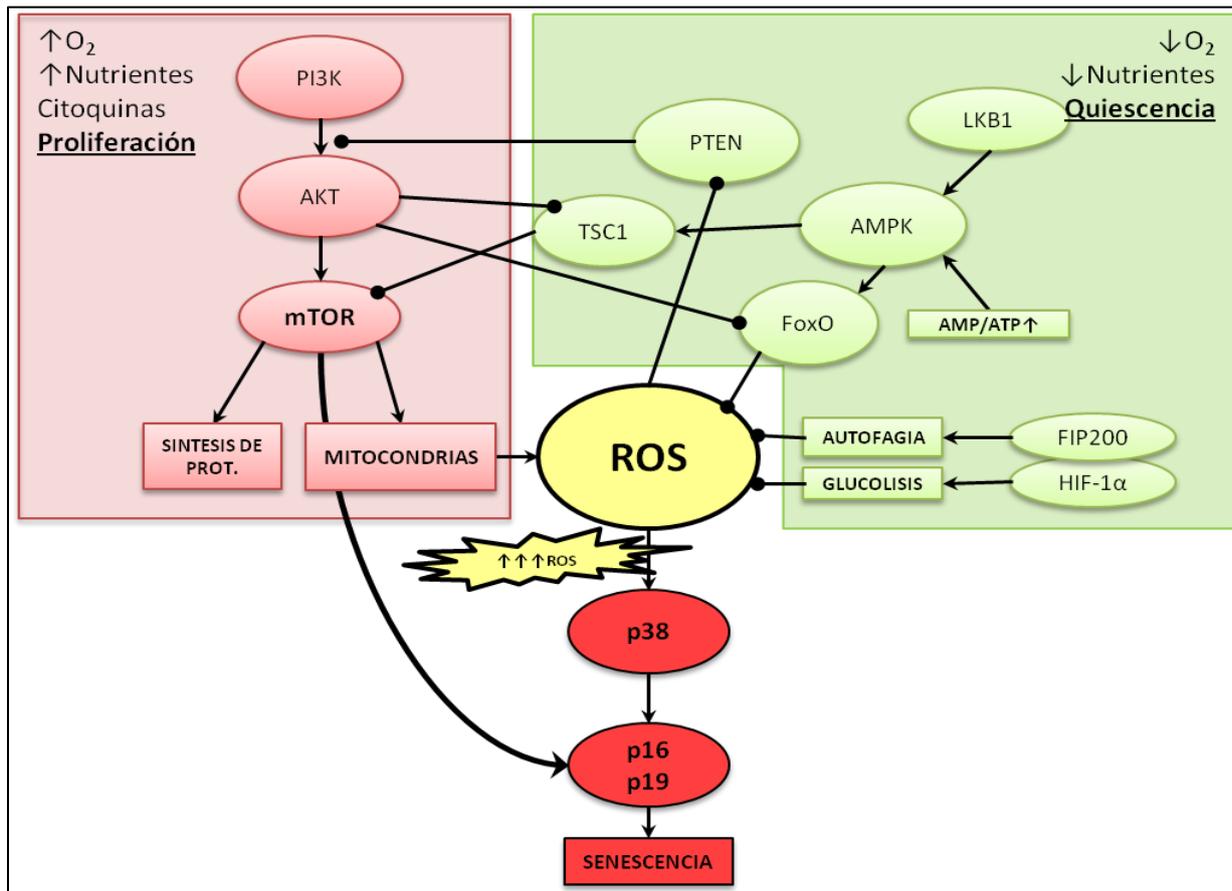


Figura 6. Regulación de SIRT1 y AMPK en la diferenciación de MSCs.

## I.5 IMPLICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN CÉLULAS MADRES

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan principalmente en la mitocondria y la cadena respiratoria de la pared mitocondrial contribuyendo a la producción de radicales hidroxilos ( $\text{HO}^\bullet$ ) y superóxidos ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), entre otras especies. Estos radicales se producen durante la respiración, donde una pequeña proporción de  $\text{O}_2$  se convierte en radicales superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ) por acción del complejo I y del complejo III de la cadena respiratoria. Las ROS reaccionan con los ácidos grasos insaturados (PUFAs) en la célula y membranas mitocondriales, donde se encuentran los fosfolípidos, esfingolípidos y cerebrosídeos, que contienen estos PUFAs en su estructura, alterando su permeabilidad e integridad, y causando daño celular. Aparte de esta producción pasiva por la mitocondria, las ROS intracelulares pueden ser generadas directamente por el enzima NADPH oxidasa (Nox). Las ROS generadas por Nox están involucradas en la movilización y proliferación de células madre. Existen varias isoformas identificadas de Nox: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 y Nox5. En las ADSCs existe una alta concentración de Nox4 y Nox5 y una expresión baja de las demás (Park *et al.*, 2011). Se sabe de la resistencia de las ADSCs al estrés oxidativo por la expresión elevada de genes de respuesta al estrés (Valle-Prieto and Conget, 2010). Las ADSCs parecen mostrar resistencia “*per se*” al estrés oxidativo y, además participan en la protección frente al daño oxidativo de las células vecinas. Este argumento parece demostrarse en estudios donde se usaban medios condicionados para ADSCs, en los que se mostraban los efectos antioxidantes y antiapoptóticos de estas células por diversos factores como, por ejemplo, la superóxido dismutasa o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Kim *et al.*, 2011). Otra argumentación es que las ADSCs parecen resistentes a bajos niveles de ROS, ya que el nicho donde se encuentran se caracteriza por una tensión baja de oxígeno (2-8% de concentración de  $\text{O}_2$ ). Este estado de hipoxia (2% de concentración de  $\text{O}_2$ ) parece ser crucial para mantener las propiedades de las células madre. Tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, se ha observado que la hipoxia potencia las capacidades proliferativas y de auto-renovación de estas células (Kobayashi and Suda, 2012). Ante la elevación de las ROS en las membranas citosólicas y de la mitocondria se activan los receptores tipo tirosín-kinasa y tipo no-tirosín-kinasa en las ADSCs. El primero en fosforilarse sería PDGFR- $\beta$ , seguido por la fosforilación de las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y ERK1/2. Estas vías activadas inhiben la degradación del factor inducido por la hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), con lo que aumentarían los niveles de este factor en las ADSCs. El HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo, donde modula la transcripción

de sus genes diana tras la unión al elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) en el núcleo (Kim *et al.*, 2011). Por ejemplo, entre los genes se encuentra el factor de crecimiento endotelial (“vascular endothelial growth factor”, VEGF), que incrementa su expresión. Se han llevado a cabo estudios que comprueban el efecto de este estrés oxidativo en los procesos celulares. Un nivel alto de ROS ocasiona el bloqueo del complejo I mitocondrial y la ATP sintasa, asociándose a un descenso en la proliferación de las ADSCs (Carrière *et al.*, 2004).



**Figura 7.** Vías de señalización asociadas a la generación y eliminación de ROS en células madre.

Este hecho es una demostración de la influencia del metabolismo de ROS en la disfuncionalidad de las células madre adultas (Moldovan, 2005), mostrando una capacidad de restauración limitada y desempeñando un papel trascendente en las patologías relacionadas con el envejecimiento (Dimmeler and Vasa-Nicotera, 2003; Ito *et al.*, 2006), siendo un objetivo primordial investigar sobre la disfuncionalidad de las ADSCs en situación de estrés oxidativo. Sin embargo, niveles bajos o intermedios de ROS pueden tener efectos positivos (Ayala *et al.*, 2014; Sart *et al.*, 2015). Podemos afirmar que bajas concentraciones de  $O_2$  y una baja actividad metabólica mantienen las células madre en un estado de quiescencia por activación de LKB1 que activa a su vez  $AMPK\alpha$ , y se inhibe la vía mTOR. Esto ocasiona un

descenso de la síntesis de proteínas necesarias para los procesos de diferenciación, y se evita al mismo tiempo la producción de ROS por actividad metabólica de las mitocondrias (Carling *et al.*, 2008; Herrero-Martín *et al.*, 2009; Pantovic *et al.*, 2013). Por otro lado, un aumento de O<sub>2</sub>, o el incremento de nutrientes que genera más actividad metabólica, o el de citoquinas que induzcan la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR, promueven la síntesis de proteínas necesarias para la diferenciación (Miyamoto *et al.*, 2007). Un exceso de ROS provoca la activación de p38MAPK que activa los factores de transcripción de senescencia p16 y p19 y conduce al agotamiento de las células. Yilmaz *et al.*, (2006) afirman que la activación en exceso de PI3K/AKT/mTOR también conduce a un agotamiento de las células madre. Parece evidente que el control de la concentración intracelular de ROS es esencial para determinar la proliferación de ADSCs (Figura 7).

También, se ha investigado el efecto de las ROS en la migración de las ADSCs. Cuando existe un daño local o inflamación se sesgregan ROS y quimioquinas desde las células dañadas, lo que induce la migración de las ADSCs hacia el lugar del daño. La hipoxia incrementa significativamente la migración de las ADSCs humanas, como demuestran experimentos *in vitro*, mientras que el bloqueo de la generación de ROS disminuye la migración (Kim *et al.*, 2011; Sart *et al.*, 2015). La diferenciación, aparte del protagonismo de los múltiples factores de transcripción y señalización extracelular descritos en el apartado anterior, también parece estar regulada por ROS. En caso de la adipogénesis, los resultados son controvertidos. Por un lado, la generación de ROS mitocondriales se correlaciona con un control positivo de represores adipogénicos, como CHOP-10 (Carrière *et al.*, 2004), y se activa la adipogénesis. Por otra parte, un aumento de ROS intracelular vía Nox4 reprime la diferenciación adipogénica (Kanda *et al.*, 2011). La hipoxia también parece inducir la diferenciación condrogénica, mientras que inhibe la osteogénesis (Merceron *et al.*, 2010). Los últimos estudios (Atashi *et al.*, 2015) demuestran que se requiere niveles más elevados de ROS para la diferenciación adipogénica que para la diferenciación osteogénica, siempre que esos niveles no sean perjudiciales para la célula.

## I.6 EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LAS MSCs

### I.6.1 Rutas bioquímicas implicadas en el envejecimiento

El envejecimiento biológico se puede definir como la pérdida progresiva de las funciones óptimas de un organismo como consecuencia de factores intrínsecos (Parrado *et al.*, 1999; Kasapoglu and Ozben, 2001; Proud, 2007). Aunque existen varias hipótesis que intentan explicar las causas del envejecimiento, sólo unas pocas están ampliamente aceptadas, lo cual no quiere decir que sean las correctas. Entre estas hipótesis se encuentra la pionera de Harman (1956), con 60 años de antigüedad, y continuamente revisada, que postula que el daño macromolecular inducido por las ROS es el factor causal principal del proceso de envejecimiento. Las ROS se originan durante el curso del metabolismo normal, principalmente en las reacciones de destoxicación mediadas por el sistema citocromo P-450 microsomal y en la transferencia de electrones en el interior de la mitocondria (Ayala *et al.*, 1996; Herrero *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011; Gonzalez-Freire, *et al.*, 2015). Dentro de este contexto, se ha considerado el daño oxidativo de proteínas específicas como uno de los mecanismos por el que se relaciona el estrés oxidativo con la pérdida de funciones fisiológicas que se produce en el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. Cuanto más relevante sea la proteína afectada, mayores serán las repercusiones fisiológicas de esa oxidación. En este sentido, hay que mencionar que no todas las proteínas son igualmente susceptibles al daño oxidativo, sino que una determinada especie oxidante actúa específicamente sobre una determinada proteína, y no sobre otras, lo que va a determinar su efecto fisiológico (Parrado *et al.*, 1999). Cuando los organismos envejecen se produce una disminución considerable de la síntesis proteica (Ryazanov and Nefsky, 2002), similar a la que se produce tratando animales jóvenes con compuestos oxidantes. En animales viejos, la síntesis proteica puede llegar a disminuir un 60-80% (Thornton *et al.*, 2003). Esto conlleva a una menor disponibilidad de proteínas para el mantenimiento, reparación y funcionamiento normal de la célula. Las causas de esta disminución no están claras todavía, puesto que son muchos los componentes implicados en las tres etapas de la traducción (iniciación, elongación y terminación). En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto que la etapa de elongación resulta especialmente afectada por el envejecimiento (Ayala *et al.*, 1996; Parrado *et al.*, 1999; Ayala *et al.*, 2014). Así, hemos podido comprobar que si el hígado de una rata joven tarda en leer un mRNA de tamaño medio 60 segundos, una rata vieja lo hace en 240 (Parrado *et al.*, 1999). Esta ralentización parece estar relacionada con las alteraciones que sufre el Factor de Elongación-2 eucariota (“Eukaryotic Elongation Factor”, eEF-2), proteína que cataliza el

desplazamiento del ribosoma a lo largo del mRNA. Con el envejecimiento, esta proteína pierde actividad, presenta un mayor nivel de oxidación en su molécula y se fragmenta específicamente por acción de los agentes lipoperoxidantes, y no por la acción de otros compuestos oxidantes (Argüelles *et al.*, 2006a). Por otro lado, y a la inversa, un aumento desproporcionado de la síntesis de proteínas puede conducir a un envejecimiento prematuro (Yilmaz *et al.*, 2006; Borodkina *et al.*, 2014; Mazzoccoli *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015). Por consiguiente, la precisión y el control estricto de la síntesis de proteína adecuada parece esencial (Mazzoccoli *et al.*, 2014; Atashi *et al.*, 2015; Ido *et al.*, 2015; Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Por ejemplo, la acumulación de proteínas mal traducidas puede conducir a la neurodegeneración (Drummond and Wilke, 2008). Además, la síntesis de proteínas es un proceso costoso que consume tanto aminoácidos como energía. De hecho, la proporción de la energía celular utilizada en la síntesis de proteínas se estima que es tan alta como el 30-40% del ATP total (Hands *et al.*, 2009). Esta consideración es importante no sólo con respecto a la energía global celular, sino también porque la producción de ATP en la mitocondria se asocia con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Herrero *et al.*, 2008; López-Lluch *et al.*, 2008; López-Lluch and Navas, 2015) lo que puede conducir curiosamente a una mayor oxidación de proteínas, llegando a generar un círculo vicioso (Sorolla *et al.*, 2012; Ayala *et al.*, 2014). Sin una respuesta antioxidante adecuada esta situación puede conducir a apoptosis.

La implicación de la vía mTOR en estos procesos parece crucial. Su activación se lleva a cabo a través del receptor de insulina IGF (Insulin-like Growth Factor). mTOR fosforila e inactiva a 4E-BP1, proteína que bloquea a eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) cuya misión es iniciar la síntesis de proteínas. Si mTOR se activa, eIF4E queda libre para iniciar la traducción. Pero también existe otra ruta por la que mTOR induce la desfosforilación del eEF2, promoviendo que esta proteína pueda llevar a cabo la elongación del ribosoma a lo largo del mRNA, controlando así no sólo los procesos de iniciación sino también los de elongación de la síntesis de proteína (Hands *et al.*, 2009; Laplante and Sabatini, 2012; Leprévier *et al.*, 2013). Una alta activación de la vía mTOR conduce a envejecimiento y su inhibición con rampamicina aumenta la longevidad de las células en cultivo (Gharibi *et al.*, 2014). Los mecanismos de control que ejerce mTOR sobre eEF2 son muy importantes, pues la actividad/cantidad de eEF2 fluctúa en muchas circunstancias y por mecanismos diversos, lo cual no parece compatible con el hecho de que el eEF2 se considere un actor secundario en el control de la traducción. Así, la actividad/cantidad de eEF2 puede

verse afectada por: fosforilación (Ayala *et al.*, 1996; Leprivier *et al.*, 2013), estrés oxidativo durante el envejecimiento (Ayala *et al.*, 1996; Argüelles *et al.*, 2006b), interacción con otras proteínas (Argüelles *et al.*, 2014), disponibilidad de energía o estado energético de la célula (Horman *et al.*, 2002) y ADP-ribosilación (Parrado *et al.*, 1999; Argüelles *et al.*, 2014).

### **I.6.2 Efecto del envejecimiento en las MSCs**

Las MSCs permanecen en el organismo durante toda la vida, sufriendo procesos continuados de auto-renovación y diferenciación, para mantener y reparar los tejidos del linaje mesodérmico. Con la edad, sin embargo, los cambios en su microambiente y diferentes procesos celulares intrínsecos conducen a la disminución en su número y funciones (Gharibi *et al.*, 2014). Del mismo modo, cuando se aíslan y se cultivan *in vitro*, se ven afectadas por diversos factores extrínsecos, disminuyendo rápidamente su potencialidad. Los efectos combinatorios de los cambios genómicos, epigenómicos, y proteómicos conducen a una disminución de las funciones de las células madre que, a su vez, contribuye a la disfunción del tejido implicado y al envejecimiento del organismo. Dado que las células madre disfuncionales dan lugar a células diferenciadas anormales en el tejido, el envejecimiento celular exagera las influencias extrínsecas del envejecimiento (Mazzoccoli *et al.*, 2014). La edad y la restricción calórica originan una amplia remodelación del tejido adiposo blanco. De todos modos, actualmente se desconocen muchos aspectos de cómo esta remodelación afecta a la población de células madre residentes. El envejecimiento induce una acumulación de ADSCs disfuncionales, aunque la proliferación de estas células disminuye un 7-10%. La restricción calórica parece atenuar la tendencia de acumulación de ADSCs disfuncionales, ejerciendo efectos antiproliferativos sobre las ADSCs. Por el contrario, esto puede ser una desventaja para aplicaciones en Medicina Regenerativa de las ADSCs (Schmuck *et al.*, 2011).

Las MSCs aisladas de donantes con edad más avanzada poseen un menor número de células de renovación rápida y de unidades formadoras de colonias. Por otra parte, se observan morfológicamente un mayor número de células con aspecto agrandado. Todo ello implica que el proceso de envejecimiento supone una pérdida de la proliferación y una disminución de la pluripotencialidad de diferenciación (Fehrer and Lepperdinger, 2005). Las células senescentes parecen ser, por lo general, distintas de aquéllas, que se encuentran en estado de reposo. La senescencia es en gran medida un estado irreversible. Normalmente, las células madre se encuentran en reposo en una fase quiescente *in vivo* durante períodos prolongados de tiempo. Sólo podrían volver a entrar en el ciclo celular activado a través de

una señal adecuada, a fin de promover los procesos de regeneración y reparación, mientras que otras células somáticas permanecen detenidas. Aunque parecen bien establecidos los procesos de envejecimiento que afectan a todas las células, continuamente aparecen estudios contradictorios sobre la correlación de la edad con algún parámetro, como la cinética de crecimiento o el potencial de diferenciación de las ADSCs. Como las MSCs son progenitores para osteoblastos y adipocitos, se ha sugerido que los cambios intrínsecos relacionados con la edad en las MSCs pueden estar involucrados en la pérdida ósea y el aumento de grasa asociada con la edad avanzada (Moerman *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008). De hecho, hay estudios con donantes de diferentes edades en los que se observa cómo disminuye el potencial osteogénico y se promueve la formación adipogénica (Moerman *et al.*, 2004; Kunter *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008). Sin embargo, otro estudio mostró que el envejecimiento sólo afectaba al potencial osteogénico, pero no al adipogénico (Le Blanc *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009). Por último, también hay resultados que indican que ni el potencial osteogénico ni el adipogénico de las MSCs dependen de la edad del donante (Justesen *et al.*, 2002; Tokalov *et al.*, 2007; Siegel *et al.*, 2013). Varias razones pueden aducirse para explicar tan diversos resultados, que podrían implicar desde la población de muestreo y la arquitectura del tejido (Fehrer and Lepperdinger, 2005), hasta la diversidad en las condiciones de extracción de células, aislamiento y mantenimiento del cultivo (Sethe *et al.*, 2006).

## **I.7 PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS MSCs**

Otro hecho importante es el carácter inmunomodulador que poseen las MSCs, aunque existen resultados controvertidos al respecto. Lo que es evidente es que las MSCs pueden tanto estimular el sistema inmune como provocar la inmunosupresión (Yagi *et al.*, 2010; English and Mahon, 2011; Dazzi *et al.*, 2012). Hay quien sostiene que son células inmunoprivilegiadas porque su presencia no causa reacción antigénica por parte del sistema inmunitario, lo que, en un principio, convierte a estas células en aptas para trasplantes (Yagi *et al.*, 2010). Sin embargo, existen evidencias de que no son tan privilegiadas como parecen y provocan una respuesta inmunitaria y una menor supervivencia de las MSCs trasplantadas (Eliopoulos *et al.*, 2005; Coyne *et al.*, 2006), aunque se sugiere que puede deberse a alteraciones producidas por las técnicas de cultivo y las manipulaciones posteriores *in vitro* (Eggenhofer *et al.*, 2014; Levin *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las MSCs expresan receptores tipo “toll” (TLR) (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, y TLR6, pero no TLR7, TLR8, TLR9 y TLR10). Imitando

condiciones inflamatorias en cultivo, las MSCs expresaban TLR2, TLR3 y TLR4, mientras TLR6 disminuía. También las citoquinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p35 y factor de crecimiento de transformación  $\beta$  (TGF $\beta$ ) se expresan constitutivamente por MSCs (Liotta *et al.*, 2008; Raicevic *et al.*, 2010; English and Mahon, 2011). La inflamación causa una significativa regulación al alza de la expresión de TLR2, TLR3 y TLR4 disminuyendo la capacidad inmunosupresora de MSCs. Este efecto aumentó aún más cuando poli(I:C) y LPS fueron utilizados como agonistas, provocando un aumento de la sensibilidad en los casos de TLR3 y TLR4. Estos datos parecen sugerir que la inflamación es responsable de un bucle de retroalimentación positiva asociado con un cambio en los perfiles de citoquinas proinflamatoria en las células madre mesenquimales (Romieu-Mourez *et al.*, 2009; Raicevic *et al.*, 2010).

Otro hecho a tener en cuenta es que las MSCs expresan un complejo de mayor histocompatibilidad (MCH), cuyos niveles dependen a su vez de los niveles de citoquinas. Se ha demostrado (Yagi *et al.*, 2010) que los bajos niveles de IFN- $\gamma$  causan un aumento de MCH-II, lo que convierte a las MSCs en células presentadoras de antígenos (APCs). Por el contrario, altos niveles de IFN- $\gamma$  ó TNF $\alpha$  disminuyen la expresión de MCH-II y producen inmunosupresión en linfocitos T, células NK, células DC y otras. Se liberan incluso citoquinas como PGE y TGF $\beta$  (Yagi *et al.*, 2010; Dazzi *et al.*, 2012), galectina-1, SDF-1 $\alpha$  y TSG6, las cuales han demostrado poseer un efecto inhibitor sobre la microglía (Gieseke *et al.*, 2010; Starossom *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). Hipotéticamente, cuando las MSCs están expuestas a un daño, tal como una infección bacteriana, las moléculas MCH-II facilitan la presentación de antígenos bacterianos, lo que conduce a la activación de células T. Estas últimas células producen IFN- $\gamma$ . A niveles altos, a través de IFN- $\gamma$  se disminuye la expresión de MCH-II para eliminar la presentación de antígenos e inhibir las células T activadas (Chan *et al.*, 2006; Yagi *et al.*, 2010; English and Mahon, 2011).

Estos resultados sugieren un modelo en el que la inflamación, en ausencia de moléculas asociadas a agentes patógenos (PAMP), estimula o permite a las MSCs promover la reparación (no fibrótica) y regular la inflamación. Por el contrario, en presencia de PAMPS y activación de la señalización TLR, las MSCs son menos supresoras de la inflamación y adoptan un carácter más fibrótico (Liotta *et al.*, 2008; English and Mahon, 2011; Thakur *et al.*, 2013; Ulrich *et al.*, 2015). Si esta hipótesis resulta correcta, MSCs puede ser particularmente eficaz en la supresión de la inflamación crónica asociada con la

autoinmunidad, sin perjudicar las respuestas inflamatorias esenciales para la defensa antimicrobiana (English and Mahon, 2011; Eggenhofer *et al.*, 2014).

Sin embargo, existe todavía una falta de consenso en el modo por el cual las MSCs responden a diferentes ligandos de los receptores TLR, debido a estudios contradictorios sobre diversos efectos de la activación de TLR en MSCs (Eggenhofer *et al.*, 2014; Levin *et al.*, 2014). Esta disparidad observada podría deberse a diferentes razones. Una de ellas es que las MSCs mantenidas en cultivo, bajo condiciones que permiten la proliferación de una multitud de unidades formadoras de colonias (CFU-F) independientes, puede conducir a una población multiclonal, en la que cada clon se diferencia de la otra población en su capacidad intrínseca para responder a TLRs de diferente manera. Igualmente, es posible que el cultivo *in vitro* pueda causar cambios transitorios o permanentes en las MSCs, dando lugar a MSCs con diferentes propiedades. Existe la posibilidad de que poblaciones de MSCs *in vivo* presenten diferente respuesta a la activación de TLR. Se conseguiría crear así respuestas divergentes: por un lado, algunas MSCs regenerarían el tejido dañado y por otro lado, las MSCs permanecerían quiescentes para activar luego los procesos de auto-renovación y mantenimiento del “pool” de MSCs en los tejidos (Levin *et al.*, 2014).

## **I.8 SEGUIMIENTO CELULAR MEDIANTE EL USO DE GENES INDICADORES GFP-LUC**

Hoy en día, las técnicas de imagen *in vivo* se usan para valorar el potencial regenerativo *in vivo* e *in situ* de una terapia celular. Los sistemas de imagen no-invasivos basados en la bioluminiscencia de células madre marcadas con luciferasa proporcionan una sensibilidad inigualable debido a la ausencia de expresión de luciferasa endógena en células de mamíferos, añadido a la baja luminiscencia de fondo que irradian los animales (Li *et al.*, 2015b). Esta técnica proporciona una herramienta importante para estudiar la biología de estas células *in vivo*, proporcionando una mayor comprensión de su supervivencia, migración, inmunogenicidad y potencial de tumorigenicidad en un animal vivo.

Normalmente, las células madre son transducidas mediante un constructo o combinación de GFP-luciferasa (GFP-Luc) en un proceso de transfección que emplea un plásmido que contiene los genes indicadores. Como alternativa, se pueden aislar células que expresan luciferasa de un animal transgénico con GFP-Luc, que luego se inyectan al sujeto experimental. Tras la inyección sistémica, se usa una cámara con dispositivo CCD (*charge-*

*couple device*) para localizar la señal luminosa producida por la luciferasa *in vivo*, pudiéndose monitorizar la supervivencia celular, así como la ampliación y “homing”<sup>2</sup> celular. Es necesario, para registrar la señal bioluminiscente, inyectar D-luciferina al animal como sustrato de la luciferasa (de Almeida *et al.*, 2011).

Uno de los procesos más eficientes para realizar el seguimiento de células madre marcadas es el que hace uso de los genes indicadores de luciferasa y proteína de fluorescencia verde (GFP). Hay que tener en cuenta que ciertos componentes celulares y metabolitos de las células de mamífero contienen sustancias autofluorescentes. Teniendo esto presente, a menos que la transfección con GFP esté altamente expresada o localizada, la detección celular puede verse complicada (Billinton and Knight, 2001). Además, la expresión de GFP en animales transgénicos es altamente variable, tanto en animales entre sí como entre células de un mismo animal (Swenson *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2013). Incluso, las células pueden expresar niveles elevados de GFP antes del trasplante y disminuir así su expresión después del trasplante (Lin *et al.*, 2013). Existen evidencias de que los genes que se incorporan al genoma a través del uso de lentivirus pueden sufrir una disminución de su expresión cuando se producen fenómenos de migración o diferenciación (Vroemen *et al.*, 2005). Otro factor a tener en cuenta es que el promotor asociado al gen de GFP, dependiendo del nivel con que se exprese, puede influir en una mayor o menor presencia de GFP (Mao *et al.*, 2015).

GFP es una proteína muy soluble y sólo es activa en disolución, por lo que los métodos de fijación en tejidos o células pueden afectar seriamente su fluorescencia (Tsien, 1998; Dower *et al.*, 2007; Patterson, 2007). El empleo de una cámara de alta sensibilidad CCD (“charge-coupled device”), permite obtener imágenes en tiempo real del destino celular durante los 20 días posteriores a la aplicación (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea) en una rata inmunodeprimida (sin pelos en la zona de registro) (Wolbank *et al.*, 2007). La intensidad de bioluminiscencia es proporcional al número de células que expresan luciferasa, tanto si se obtiene la medida *in vitro* como *in vivo* (Aswendt *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015b); pero, como hemos mencionado antes, la intensidad bioluminiscente puede variar con el promotor asociado al gen (Mao *et al.*, 2015).

---

<sup>2</sup> Homing: Es el término en inglés usado para explicar cualquier mecanismo observado en las células que provoca que éstas migren hacia un tejido u órgano específico, o hacia otra localización

## I.9 POSIBLE APLICACIÓN DE LAS MSCs EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los modelos más utilizados para la enfermedad de Parkinson se basan en el uso de toxinas, las cuales se acumulan selectivamente en las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Negra (SN) causando disfunción celular, y finalmente la muerte celular. El mayor avance de estos modelos surgió con la introducción de la neurotoxina catecolaminérgica 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), que reproduce eficazmente esta patología, caracterizada fisiopatológicamente por una degeneración lenta, progresiva e irreversible de la vía dopaminérgica nigroestriatal (Espinosa-Oliva *et al.*, 2014). En cerebro de rata, se origina en el grupo celular A9, localizado en la SN pars compacta (SNpc). Los axones de estas neuronas corren a lo largo del mesencéfalo y terminan en el cuerpo estriado dorsal. Esta zona, a su vez, está constituida por el núcleo caudado y el putamen. Se habla de hemiparkinsonismo cuando se lesiona sólo una de las vías dopaminérgicas nigroestriatales, usualmente la del hemisferio cerebral izquierdo, dejando la vía nigroestriatal contralateral indemne. Por el contrario, se denomina parkinsonismo cuando se lesionan ambas vías. La neurotoxicidad de 6-OHDA está basada en la formación de especies reactivas de oxígeno como anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ) y quinonas, productos de su metabolización. Finalmente, estos compuestos comprometen e inhiben los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, ocasionando déficit de ATP y muerte neuronal. Desde el punto de vista conductual, este modelo presenta, inmediatamente después de la cirugía y de forma espontánea, una conducta rotatoria ipsilateral a la lesión (Camp *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Espinosa-Oliva *et al.*, 2014).

Los estudios con modelos animales han demostrado que la inflamación inducida por lipopolisacáridos (LPS) puede replicar algunas características de esta patología (Burguillos *et al.*, 2011a; Machado *et al.*, 2011). Los LPS se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y actúan como endotoxinas, en mamíferos, iniciando respuestas inflamatorias agudas y una amplia gama de efectos que van desde la pirexia al “shock” séptico (Liu *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha descrito que la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por LPS es dependiente de la presencia de microglía (Venero *et al.*, 2013; Kavanagh *et al.*, 2014; Burguillos *et al.*, 2015). LPS induce activación microglial que libera factores proinflamatorios y citotóxicos, como NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Galactina-3 que provocaban daño en las neuronas dopaminérgicas (Burguillos *et al.*, 2015). El protocolo para conseguir un modelo

animal de enfermedad de Parkinson se basa, usualmente en la perfusión de 8 µg de LPS ó 6 µg de 6-OHDA directamente en la vía nigroestriada de la rata, aunque 6-OHDA puede inyectarse en la vía MFB (*Medial forebrain bundle*). El tratamiento consigue inducir, entre otros procesos, una fuerte reacción en la microglía. La SN tiene especial sensibilidad al estímulo inflamatorio ya que contiene la mayor densidad de células microgliales de todo el sistema nervioso central (SNC) (Lawson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2000). Se ha asignado a la propia dopamina (DA) un papel crucial en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN, área en la que existe especialmente una alta concentración de DA (de Pablos *et al.*, 2005; de Pablos *et al.*, 2014). Tras la inyección de LPS directamente en la SN del animal aparecen pérdidas de más del 50-70% de neuronas tirosinhidroxilasa (TH) positivas en el hemisferio cerebral tratado, con respecto al control. Este efecto se puede paliar mediante la administración de  $\alpha$ -metilparatirosina ( $\alpha$ -MPT), un inhibidor de la enzima TH. Se inhibe así la síntesis de DA y se vuelve a regenerar dicho daño con la posterior administración de un precursor de la DA, la L-DOPA. Esto señalaría a la DA como uno de los factores causantes de la muerte neuronal durante el proceso inflamatorio provocado por LPS (de Pablos *et al.*, 2005; de Pablos *et al.*, 2014; Espinosa-Oliva *et al.*, 2014).

El hecho de que el proceso inflamatorio que se da en la SN tras la inyección de LPS afecte a las neuronas dopaminérgicas (Herrera *et al.*, 2000) sugiere que la inflamación debe estar involucrada en ciertos procesos neurodegenerativos del sistema dopaminérgico de la vía nigroestriada, como por ejemplo la enfermedad del Parkinson. Se ha descrito que el incremento de la síntesis de citoquinas inflamatorias por parte de la glía que se encuentra en la SN, en pacientes afectados por la enfermedad, produce la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas, debido a su alta selectividad al estrés oxidativo (Floor and Wetzel, 1998). Las propiedades inmunomoduladoras descritas en el anterior epígrafe convierten a las MSCs en posibles candidatas para realizar terapia celular en enfermedades neurodegenerativas provocadas por procesos inflamatorios. Sin embargo, los diversos autores que han abordado estas investigaciones han obtenido resultados contradictorios. Algunos describen una neuroprotección *in vivo* o *in vitro* (Wang *et al.*, 2010a; Stemberger *et al.*, 2011; Whone *et al.*, 2012; Ooi *et al.*, 2015), mientras que otros no aprecian una significativa neuroprotección (Camp *et al.*, 2009; Neirinckx *et al.*, 2013; Schwerk *et al.*, 2015).

## I.10 CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación, en algunos casos también llamada crioconservación, es el sistema de almacenamiento más usado en los laboratorios biológicos y médicos para preservar tejidos y células a temperaturas muy bajas ( $-196^{\circ}\text{C}$  en  $\text{N}_2$  líquido), en estado de vitrificación, durante largos periodos de tiempo (Lovelock and Bishop, 1959). Este procedimiento combina, por una parte, la detención criogénica de reacciones bioquímicas no deseables con, por otra, el descenso de la actividad del agua ( $a_w$ ) inducido por la congelación, lo que mantiene la biología celular en suspensión temporal (Langer and Vacanti, 1993). Aunque en sus inicios su uso se extendió a la criopreservación de espermatozoides, hoy en día su utilización se haya ampliamente distribuida en todos los tipos celulares, con el fin de realizar un trasplante que requiriese un período prolongado de almacenamiento de las células madre (Takahashi *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2005). Tanto la Unión Europea (CEE, 1394/2007) como la “Food and Drug Administration” (FDA) americana consideran a la criopreservación como una “mínima manipulación” y, por consiguiente, este procedimiento no altera características biológicas relevantes de las células madre como la proliferación, el fenotipado o la multipotencialidad (Gonda *et al.*, 2008; Mambelli *et al.*, 2009; Pacchiarotti *et al.*, 2013).

Existe una región crítica de temperatura durante la congelación y descongelación, donde es bastante perceptible el daño a las células. Para mantener la integridad celular y reducir la formación de hielo intracelular, a lo largo de una zona crítica, es necesario usar agentes crioprotectores (CPAs) en el proceso de criopreservación. La inclusión de un agente crioprotector a la suspensión celular, antes del proceso de congelación, origina una sensible reducción del tramo de esta región crítica. La acción coligativa de los CPAs permite a la célula sobrevivir en condiciones de una reducción de su contenido de agua o disminución de hielo intracelular (dañino) a  $-196^{\circ}\text{C}$  (McGann, 1978). En un sentido cronológico, los agentes crioprotectores más usualmente utilizados han sido glicerol y glicoles, dimetilsulfóxido (DMSO), azúcares, hidroxietilalmidón (HES), y algunos polímeros (Hubel, 1997; Stolzing *et al.*, 2012). El uso de glicerol y glicoles, como etilen- y propilenglicol, se abandonó pronto, como consecuencia de su bajo poder de penetración celular y su nivel de toxicidad relativa. El polietilenglicol (PEG) originaba daño celular debido a la elevada presión osmótica y a la fusión celular (Norwood *et al.*, 1976; Xu *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013).

El DMSO es el más comúnmente empleado como crioprotector para una conservación más eficaz a largo plazo, no existiendo todavía consenso para la sustitución por

otro crioprotector con mejores prestaciones (Meagher and Herzig, 1993; Lee *et al.*, 2013). Sí han existido numerosos intentos para reducir el porcentaje de DMSO en la mezcla crioprotectora por combinación con otros crioprotectores (Lee *et al.*, 2005; de Lima-Prata *et al.*, 2012; Stolzing *et al.*, 2012), aunque la eficacia no se ha mejorado. Asimismo, la concentración eficaz de DMSO utilizada ha sido la misma desde siempre, oscilando entre 5 y 10% v/v de DMSO en la disolución de congelación (Hubel, 1997; Bakken *et al.*, 2003). A esas concentraciones el DMSO es el crioprotector más eficaz porque tamponiza el aumento de la concentración de solutos durante el proceso de congelación manteniendo así la integridad celular (Meryman, 1971; Connor and Ashwood-Smith, 1973) y evitando en gran medida los fenómenos de formación de cristales (Adams *et al.*, 1997; Hubel, 1997; Mishima and Suzuki, 2002). Cuando DMSO se emplea a concentraciones por debajo del 5% v/v puede ocasionar una reducción del espesor de la membrana celular e inducir poros de agua temporales. Por el contrario, concentraciones superiores al 20% v/v pueden inducir la desintegración de la estructura bicapa de la membrana (Gurtovenko and Anwar, 2007).

Las propiedades antioxidantes del DMSO, que han sido puestas en evidencias desde la década de los 1990s (Takahashi *et al.*, 1988), se adscribían a su eficiencia como perturbador del enlace de hidrógeno y a su reactividad específica con los radicales hidroxilos ( $\text{HO}^\bullet$ ) (Tselkas *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003; Kashino *et al.*, 2010). La reacción con el radical  $\text{HO}^\bullet$ , muy dañino, conduce a productos termodinámicamente favorecidos, como los radicales  $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{CH}_2^\bullet$ ,  $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{CH}_3^\bullet$ ,  $\text{CH}_3\text{SO}^\bullet$ , y  $\text{CH}_3\text{OH}^\bullet$  (de Souza-Sombrio *et al.*, 2004) y aductos como el malonildialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Guillén-Sans and Guzmán-Chozas, 1998; Guzmán-Chozas *et al.*, 1998). Por tratarse de un compuesto anfifílico, DMSO puede alcanzar altos niveles intracelulares, siendo capaz de reducir la peroxidación lipídica iniciada por los radicales hidroxilos ( $\text{HO}^\bullet$ ) (Sun *et al.*, 2008), o de reducir la formación de grupos carbonilos en las proteínas, iniciada por radicales hidroperóxidos ( $\text{ROO}^\bullet$ ) (Zhou *et al.*, 2014).

En cuanto a la posible toxicidad del DMSO, a concentraciones bajas, inferiores al 1%, no resulta tóxico para las células madre; a concentraciones excesivamente elevadas, como 20% v/v, presentaban una toxicidad reconocida (David, 1972). En cualquier caso, tanto si las células madre se emplean en terapia, como si se emplean en investigación, los restos de DMSO, una vez cumplida su misión crioprotectora, se deben eliminar. Generalmente, esta actuación se lleva a cabo por diluciones sucesivas adecuadas hasta lograr el 1%, o también

mediante lavados sucesivos, centrifugación, o combinación de estos procedimientos (Antonenas *et al.*, 2004; Perotti *et al.*, 2004; Windrum *et al.*, 2005).

El hecho de que la criopreservación tenga especial interés se debe a que las MSCs, durante su cultivo y expansión, pueden sufrir cambios en el genotipo, fenotipo y capacidad de diferenciación y proliferación (Haasters *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Markarian *et al.*, 2014), por lo que resultaría esencial mantener las características iniciales y poder almacenar las células durante un largo período de tiempo hasta su uso en investigación o en clínica aplicada.

## **II. AIMS (ENGLISH)**



Adipose tissue has proven to serve as an abundant, accessible and rich source of adult stem cells with multipotent properties suitable for tissue engineering and regenerative medical applications. However, nowadays there are many unknowns yet unresolved aspects about their biology and behavior that must be addressed before using them in cell therapy.

In the first part, we presented and described in detail the isolation methods, expansion, differentiation and cryopreservation of humans and rats ADSCs, following the ISCT indications.

Once established ADSCs as MSCs, we have attempted to elucidate the particular differences between both rADSC and hADSC compared to other cellular lines.

We have studied the levels of eEF2 along with proteins affecting the homeostasis, multipotentiality and differentiation of ADSC as a function of the age.

We have attempted to elucidate the effects of oxidative stress *in vitro* caused by CH on hADSCs from donors of different age. Different cryopreservation methods in rADSC have been tested.

We have attempted to elucidate the effects of oxidative stress *in vivo* caused by CH that could affect the protein homeostasis, multipotentiality and differentiation of rADSC.

By other hand we have attempted to use a cell track system to identify the cells fate after transplantation.

Finally, once we have elucidated all above we have attempted to use rADSC in a model of Parkinson disease in rats to evaluate their possible neuroprotection.



## **III PARTE EXPERIMENTAL**



### III.1 APARATOS.

- Campana de flujo laminar horizontal Telstar AH-100 (Telstar, Bristol, USA).
- Autoclave JP.- Selecta (JP Selecta, Barcelona, Spain).
- Centrífugas Eppendorf Mod. 5804R y 5810R (Eppendorf, Hamburg, Germany).
- Filtros celulares Cell Strainer de 40  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$  (Becton Dickinson, NJ, USA).
- Frascos de cultivo Corning Flask T25 y T75 (Corning, NY, USA).
- Incubador RS Biotech Galaxy R (New Brunswick Scientific, Enfield, USA).
- Viales criogénicos Corning criotube (Corning, NY, USA).
- Congelador Nalgene Cryo Freezing Container (Mr. Frosty) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).
- Contador celular Countess<sup>®</sup> Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Logan, UT, USA).
- Separación magnética MACS<sup>®</sup> Separators (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany).
- Citómetro de flujo Beckman-Coulter FC500 (Beckman-Coulter, Pasadena, CA, USA).
- Lector de placas Microplate Reader ASYS UVM340 (Biochrom, Cambridge, UK).
- Microscopio Nikon Eclipse TS500 equipado con un sistema de análisis de imagen Nikon digital Sight DS-U3 (Nikon, Tokio, Japan).
- Microscopio Zeiss Axioskop 40 para obtención de imágenes de epifluorescencia (Zeiss, Jena, Germany).
- Microscopio confocal Zeiss LSM7 DUO para imágenes de fluorescencia confocal (Zeiss, Jena, Germany).
- Microscopio Olympus BX61 para la obtención de imágenes en campo claro y estereología (Olympus, Allentown, USA).
- Aparato IVIS LuminaII para imágenes de bioluminiscencia óptica (Xenogen Corp, Alameda, CA, USA).
- Dispositivo LAS-3000 MINI para revelado de Western Blots (Fujimil, Tokio, Japón).
- Estereotáxico para trepanación craneal (Kopf Instruments, Tujunga, CA, EEUU).
- Bomba de reperusión Mod. Thermo Scientific FH100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

## **III.2 ORIGEN DE LAS MUESTRAS**

### **III.2.1 Animales**

Se emplearon para los estudios ratas machos de la raza Wistar, de un peso entre 300 y 500 g, mantenidas en un medio de temperatura constante de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa del 60%, con un ciclo de luz-oscuridad de 12h, y acceso libre a comida y agua. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las «Guidelines of the European Union Council» (86/609/EU), siguiendo las regulaciones españolas (BOE no. 34/11370-421,2013) para el uso de animales de laboratorio, y fueron aprobadas por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla.

### **III.2.2 Humanas**

Las muestras de tejido adiposo humano se obtuvieron en las clínicas “Clínica Serres” y “Clínica Rocío Vázquez” de Sevilla. Estas muestras procedían de liposucciones realizadas a personas de distintas edades. Las muestras se almacenaban en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ), y se recogían a las 9:00 h de la mañana del día siguiente a la intervención. Junto con el consentimiento informado de la intervención, a los pacientes se les explicó brevemente el proyecto de investigación, a la vez que se les solicitó autorización expresa para la cesión de las muestras. En todos los casos se obtuvo la aprobación.

## **III.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

### **III.3.1 Estudio en las células madre de tejido adiposo de animales (rADSCs) y de humanos (hADSCs) de distintas edades**

- Humanos: Se usaron ADSCs procedentes de personas de distintas edades (25-48). Las muestras de lipoaspirados se catalogaban por la edad del paciente. Así, M39 sería una muestra de un paciente de 39 años.
- Animales: Se usaron 3 grupos diferentes de animales con edades de 9 semanas, 9 y 24 meses.

### **III.3.2 Estudio de células madre rADSCs después del tratamiento *in vivo* de los animales con hidropéroxido de cumeno (CH).**

Los animales se dividieron en tres grupos, a los que se les aplicó un tratamiento durante 30 días consecutivos, tras el cual se sacrificaron y se obtuvieron las muestras. El

grupo control fue tratado con solución salina (0,9 % de NaCl) y los otros dos con unas dosis de 40 y 80 mg/Kg de CH.

### **III.3.3 Seguimiento *in vivo* de células madre rADSCs tras el implante de rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup>**

Para los experimentos de seguimiento *in vivo* de las células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup>, se usaron tres animales para la determinación de la permanencia de la señal bioluminiscente en patas delanteras y ventrículo derecho, dos animales para estudiar la diferencia de la señal bioluminiscente entre un implante de células en sustancia nigra (SN) y otro en hipocampo (HP), dos animales a los que se inyectó a través de la vena caudal, y dos animales a los que se les administró por vía intrahepática.

### **III.3.4 Inyección de las rADSCs en diversas zonas anatómicas del animal**

La operación intracerebral se practicó realizando una trepanación del cráneo, previa anestesia con gas isoflurano (IsoFlo, Abbot House, Berkshire, UK), posicionando el animal en un estereotáxico. Las coordenadas para inyectar en SN, ventrículo (Ven) e HP fueron tomadas siguiendo el Atlas de cerebro de *Paxinos y Watson (1986)*. Todas las inyecciones se llevaron a cabo con una jeringa Hamilton Neurosyringe 700/1700 (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA), posicionado 5,4 mm posterior,  $\pm$  1,8 mm lateral y 8,3 mm ventral, con respecto al punto bregma, para SN. En el caso de Ven 2,5 mm posterior,  $\pm$  1,9 mm lateral y 4,0 mm ventral, con respecto al punto bregma. Y 4,5 mm posterior,  $\pm$  3,0 mm lateral y 3,8 mm ventral, con respecto al punto bregma, para HP. El flujo de inyección fue de 0,5  $\mu$ l/min, y el volumen total inyectado de 2  $\mu$ l de solución para inyectar en SN, 6  $\mu$ l en Ven e HP, 100  $\mu$ l para las vías intrahepática e intravenosa. El número total de células inyectadas fue  $3 \times 10^5$  en pata, hígado y ventrículo;  $1 \times 10^5$  en HP;  $3 \times 10^4$  en SN; y  $1 \times 10^6$  mediante inyección intravenosa.

### **III.3.5 Experimentos sobre el posible uso de las rADSCs en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

Para estos experimentos los animales se dividieron en 4 grupos diferentes, que se trataron bilateralmente en SN con: salino (N=4), 6-OHDA (N=6), LPS (N=8) y LPS + rADSCs (N=12), respectivamente. La operación intracerebral se practicó de igual manera que lo ya descrito en el apartado anterior, sólo que en esta ocasión se inyectaron  $5 \times 10^4$  células madre.

### III.4 METODOLOGÍAS

#### III.4.1 Aislamiento, recogida y separación de la fracción vascular estromal (SVF) de tejido adiposo de rata

Se obtuvo tejido adiposo subcutáneo de las regiones anatómicas ventrolaterales y dorsomedial de ratas Wistar macho, en campana de flujo laminar (asepsia). Para ello, se llevó a cabo una pequeña intervención quirúrgica, mediante incisión con bisturí en las mencionadas zonas. Los animales fueron previamente anestesiados con hidrato de cloral (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) al 6% p/v (se inyectaron 6 ml del anestésico por kg de peso). El tejido adiposo aislado, que se recogió en un tubo cónico de 50 ml, se microdisecionó mecánicamente hasta pequeños lóbulos de grasa, y se lavó dos veces con 20 ml de disolución tampón fosfatos salino de pH 7,2 (PBS) (Thermo Scientific, Logan, Utah, USA), con el objeto de eliminar la sangre residual. Se centrifugó a 430xg durante 10 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo cónico de 50 ml donde se le añadió 20 ml de disolución de colagenasa I (Collagenase NB4G, Serva, Islandia, NY, USA) en PBS que contenía 0,3 U/ml (U= Unidades Wünsch). Se incubó a 37°C durante 150 min, en un agitador orbital. Una vez completada la digestión enzimática, se añadió igual volumen de “medio de parada” (Dulbecco’s Modified Eagles Medium, DMEM) (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) que contenía suero fetal bovino (FBS) al 20% (Thermo Scientific, Logan, Utah, USA) y la mezcla se centrifugó a 600xg durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, y el precipitado, que constituye la fracción vascular estromal (SVF), se resuspendió en 10 ml de DMEM + 20% FBS + 1% Antibióticos (Penicilina/Estreptomicina). La suspensión celular se pasó a través de un filtro de membrana de nylon de 40  $\mu$ m de tamaño de poro, recogiendo el filtrado en un tubo cónico de 50 ml. Después, la suspensión celular se trasladó a un tubo cónico de centrífuga de 15 ml y se centrifugó a 350xg durante 10 min.

#### III.4.2 Aislamiento, recogida y separación de la fracción vascular estromal (SVF) de tejido adiposo de humano

La obtención de la SVF de tejido adiposo humano se llevó a cabo a partir de 200-300 ml de lipoaspirado extraído de pacientes de distintas edades. Las muestras obtenidas en quirófano se introdujeron en botes estériles de 100 ml (Figura 8). Cuando se procesan muestras de 250 ml de lipoaspirado se pueden



Figura 8. Muestras de lipoaspirados

obtener entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  células mononucleares en la fracción SVF. Todo el lipoaspirado se reunió en una botella de vidrio de 1 L, con tapón de rosca, y se añadió una cantidad igual de PBS. Se agitó vigorosamente para eliminar la mayor cantidad posible de sangre. Luego, toda la muestra se distribuyó en botes de centrifuga, que se centrifugaron a 430xg a 4° C durante 10 min. Tras la eliminación de la fase acuosa, la fase lipídica se diluyó con igual volumen de disolución de colagenasa (Collagenase NB 4G, Serva): 0,3 U/mL en PBS (unidades Wunsch). La mezcla se incubó a 37°C durante 60 min, en un agitador orbital (Figura 9).

Transcurrida la digestión enzimática, se añadió igual volumen de “medio de parada” DMEM + 20% FBS. Se centrifugó a 600 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 10 ml de “medio de expansión” –NH- (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) para células madre no hematopoyéticas. La suspensión celular se pasó a través de un filtro de 100  $\mu$ m (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). El filtrado recogido en tubos cónicos de 50 ml, se centrifugó a 600xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 5 ml de medio de expansión –NH-, y la suspensión se pasó a través de un filtro de 40  $\mu$ m (Becton Dickinson). El filtrado se recogió en un tubo cónico de 50 ml y, finalmente, se trasladó la suspensión celular a un tubo cónico de 15 ml (Figura 10).



Figura 9. Digestión con colagenasa.



Figura 10. Fracción VascularEstromal.

### III.4.3 Cultivo de la SVF de tejido adiposo de rata

El precipitado se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo (DMEM + 10% FBS + 1% de Antibióticos) precalentado a 37°C. Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (T75), añadiendo 10 ml de medio de cultivo. Se incubó al 95 % de humedad relativa, 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. El medio de cultivo se cambió cada 24 h, examinando regularmente el cultivo al microscopio. Se continuó con el cultivo hasta alcanzar la situación de casi confluencia (aproximadamente, 80% de confluencia), que se lograba a las 24-48 h.

Este proceso no se lleva a cabo en humanos, pues con la fracción vascular estromal humana tras los filtrados a través de las membranas de nylon, se procedió directamente con la separación magnética.

### III.4.4 Tripsinización, etiquetado y separación magnética de las células madre de tejido adiposo de rata (rADSCs) y humano (hADSCs)

Para aislar las células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata (rADSCs) a partir de la fracción vascular estromal (SVF) se utilizó un sistema de separación magnética, que emplea la tecnología MACS<sup>®</sup> (Magnetic Cell Sorting), con micropartículas magnéticas, confeccionadas con una matriz biodegradable, de un tamaño aproximado de 50 nm (Miltenyi *et al.*, 1990, Grützkau and Radbruch, 2010). El anticuerpo asociado a las “MACS-microbeads” reconoce específicamente el antígeno de superficie CD90.1 (THYmiocyte differentiation antigen-1.1) de las células rADSCs (Quirici *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2006; Lv *et al.*, 2012), las cuales quedan retenidas en la columna de separación sometidas a un potente campo magnético. Las células sin marcar pasan libremente a través de la columna y son desechadas. Posteriormente, se retira el campo magnético y las células rADSCs marcadas pueden eluirse fácilmente desde la columna (Figura 11).

Una vez alcanzada la confluencia, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar el medio residual. Luego, se añadió un volumen suficiente (aproximadamente 1 ml), para cubrir las células, de disolución de tripsina 0,05% en EDTA 0,53 mM (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA), y se incubó a 37°C durante 5-10 min. Las células “levantadas” se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml. Para inactivar la tripsina se añadió 5 ml de DMEM + 20% FBS + 1% Antibióticos, se resuspendieron las células y se centrifugó a 300xg durante 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante. Si

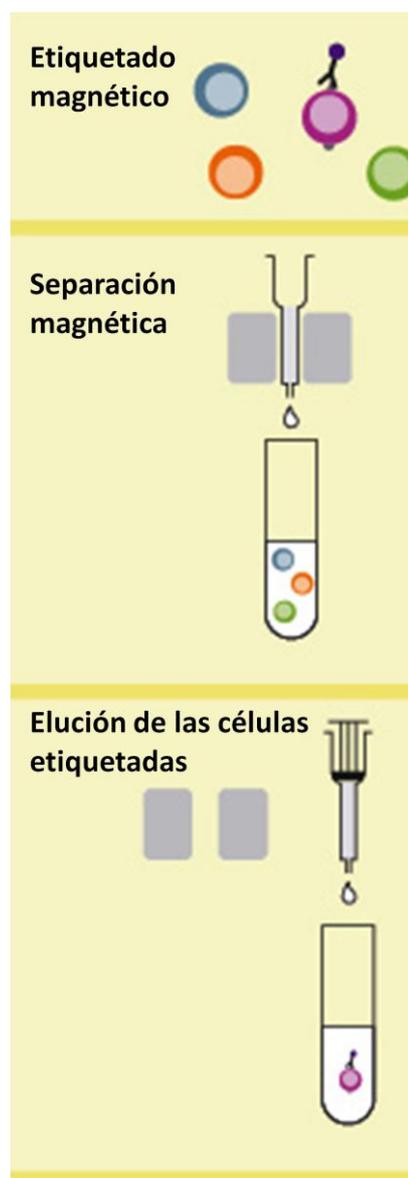


Figura 11. Separación magnética de las ADSCs

existen glóbulos rojos, se lisan con tampón de lisis para eritrocitos (Red Blood Lysis Cell Solution, Miltenyi Biotec), se vuelve a centrifugar 10 min, y se desecha el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 90 µl de tampón de enjuague (autoMACS Rising Solution, Miltenyi-Biotec). A continuación, se procedió al etiquetado de las células diana. Para ello, se añadió 10 µl de Anti-CD90.1 Microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Se incubó a 4°C durante 10 min. Se lavaron las células mediante la adición de 1 ml de tampón de enjuague y luego se centrifugó la suspensión celular a 300xg durante 10 min. Se eliminó completamente el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 µl de tampón de enjuague, quedando la muestra preparada para la separación magnética.

La suspensión celular se pasó a través de la columna del sistema MACS, previamente lavada con 3 ml de tampón de enjuague. Las células no etiquetadas se eluían con 3x3 ml de tampón de enjuague. Tras los lavados, se retiraba el campo magnético de alrededor de la columna. Las células etiquetadas, fracción celular positivamente seleccionada, se eluían con 5 ml de tampón de enjuague, recogiendo el eluido en un tubo cónico de 15 ml, que se centrifugó a 300xg durante 10 min, a 4°C.

El precipitado aislado se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo (DMEM + 10% FBS + 1% Antibióticos) y luego se procedió al cultivo mediante el procedimiento ya descrito en el Apartado III.4.3, a través de un procedimiento iterativo que supone la realización de sucesivos pases ( $P_0, P_1, P_2, \dots, P_n$ ), hasta que se alcance una población celular suficiente para realizar los diversos experimentos. Dentro de un mismo experimento todas las muestras presentaron el mismo número de pases ( $P_4$ - $P_8$ ).

En humanos se llevaron a cabo los mismos procedimientos descritos con diversas salvedades, entre las que destacamos: La utilización directa de la fracción vascular estromal sin cultivo previo para la realización de la separación magnética. Separación magnética indirecta, usando primero un anticuerpo que reconoce el antígeno de superficie CD271 (Low Neural Growth Factor Receptor, LNGFR) (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) de las células hADSCs (Quirici *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2006) y, posteriormente, un anticuerpo secundario anti-APC MACS Microbeads (Miltenyi Biotec). Para las hADSCs el medio de cultivo usado es el “medio de expansión” –NH- (Miltenyi Biotech).

Tras la separación magnética, las células se centrifugaron a 350xg y se resuspendieron en 1 ml de Medio de Expansión NH precalentado a 37 °C. Las células se cultivaron en un frasco de 25 cm<sup>2</sup> (T25) añadiendo 4 ml de Medio de Expansión NH. El

medio de cultivo se cambia a las 24 h, examinando el cultivo al microscopio regularmente y realizando resiembras cuando el cultivo alcanzaba el 80% de confluencia. Se realizaron sucesivos pases hasta alcanzar una población celular suficiente para realizar los diversos experimentos. Dentro de un mismo experimento todas las muestras presentaron el mismo número de pases (P<sub>4</sub>-P<sub>8</sub>).

#### **III.4.5 Cultivo de células HeLa.**

Para algunos experimentos se requirió el cultivo de células de la línea celular HeLa. Todos los procedimientos en cuanto al cultivo, expansión, congelación y descongelación son los mismos utilizados que para las rADSCs.

#### **III.4.6 Recuento celular y curva de crecimiento.**

Durante el cultivo y sucesivos sub-cultivos (pases) se evalúa la proliferación y morfología celular. Sólo se cuentan las células vivas (viables). Se utilizó el Countess<sup>®</sup> Automated Cell Counter, que distingue las células viables, en función de la capacidad que tiene el reactivo de tinción lipofílico Trypan Blue de penetrar a través de las membranas celulares de las células muertas. Las células viables se manifiestan por una refringencia destacada. La prueba se llevó a cabo por triplicado, mezclando 50 µl de la suspensión celular con 50 µl de la disolución Trypan Blue al 0,4% (Thermo Scientific, Logan, UT, USA). Las células viables deben observarse al microscopio y realizar el conteo de las mismas dentro de un intervalo de tiempo que no excede de los 4 min, dada la inestabilidad del reactivo Trypan Blue recién preparado. Los cambios morfológicos de la población celular fueron examinados bajo un microscopio invertido Nikon Eclipse TS500, equipado con objetivos de contraste de fases y cámara digital. La curva de crecimiento se realizó sembrando 50.000 células rADSCs por pocillo en placas de 6 pocillos y contando el número de células que han crecido en los días posteriores al cultivo, hasta un total de 7-8 días. Se sembraron, al menos, 3 pocillos por muestra y día.

#### **III.4.7 Criopreservación**

Si no se van a programar experimentos inmediatamente, es necesario conservar y almacenar adecuadamente las células madre para que no se manifieste ningún tipo de daño celular y para que no envejecan. El sistema tradicional para este fin es utilizar la criopreservación. Esencialmente, este procedimiento consiste en someter la muestra a temperaturas de congelación, a través de un proceso controlado, más o menos rápido, en

presencia de un agente crioprotector adecuado y, luego, mantener las células almacenadas durante un largo plazo a temperatura de congelación por debajo de  $-140^{\circ}\text{C}$ , normalmente, en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Después de cultivar las células hasta lograr el 80% de confluencia, y de sucesivas resiembras, tras la última centrifugación, a 0,5 ml de la suspensión celular se añadió, gota a gota, y agitando suavemente, el medio de congelación, el cual se compone del medio de cultivo más el agente crioprotector (DMSO) hasta llegar a 1 ml de volumen final. Este volumen debe ser lo más reducido posible, a fin de maximizar la recuperación de las células. A continuación, se llevó a cabo una equilibración a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante un máximo de 10 min. Se utiliza una temperatura baja en la equilibración para, por una parte, reducir la toxicidad del DMSO, y por otra, equilibrar óptimamente su concentración extra- e intracelular (Cui *et al.*, 2007). Un largo tiempo de exposición a la célula del DMSO derivaría en apoptosis, o dañaría el DNA celular (Lasky, 1991; Tichon *et al.*, 2013). Afortunadamente, este crioprotector no necesita una equilibración prolongada. La adición paulatina del medio de crioprotección, gota a gota, evita el efecto de estrés osmótico. Se añadía cantidad suficiente de DMSO para que su concentración final fuera de 5%, 10%, ó 20% v/v. La densidad celular fue, generalmente, de  $5 \times 10^5$  células/ml.

Se transfirió, posteriormente, a viales criogénicos de 1,8 ml, que se dispusieron en contenedores de congelación “Mr. Frosty”. Los viales criogénicos fueron herméticamente tapados. Se utilizó como agente congelante alcohol isopropílico en el congelador mecánico, estableciendo una velocidad de enfriamiento de  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , hasta una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , que se mantiene durante toda la noche. Finalmente, los viales criogénicos se disponen en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), para la conservación durante almacenamiento a largo plazo.

#### **III.4.8 Descongelación**

Para descongelar, los viales criogénicos se retiraron de su almacenamiento en nitrógeno líquido, y se sumergieron súbitamente en baño de agua termostatzada a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta desaparición completa de los cristales de hielo. La descongelación debe ser rápida, y se completa en unos 2 min (en apenas 1 min se pasa de  $-10^{\circ}\text{C}$  a temperatura ambiente), con el fin de evitar una posible contribución del calentamiento a la formación de ROS.

Las células, una vez descongeladas, se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml, y se añadió 5 ml de medio de cultivo (DMEM + 20% FBS + 1% Antibióticos). La suspensión celular se centrifugó a  $350\times g$ , a temperatura ambiente, durante 10 min. Se descartó el

sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio de expansión NH + 1% Antibióticos en el caso de células hADSCs, o DMEM + 10%FBS + 1% Antibióticos, en el caso de células rADSCs. Luego se continuó con los protocolos de expansión descritos anteriormente en el Apartado III.4.3.

### **III.4.9 Determinación de los antígenos de superficie (fenotipado) de las ADSCs mediante citometría de flujo**

#### **III.4.9.1 Calibración del citómetro**

Antes de llevar a cabo los experimentos se realizó un ajuste de los parámetros del citómetro de flujo, en cuanto al voltaje y la ganancia de sus fotomultiplicadores, así como a las compensaciones entre los distintos fluoróforos a utilizar. Para ello, se usaron células sin ningún tipo de marcador, para establecer el mínimo de fluorescencia y los voltajes y ganancias para el tamaño celular (FS Lin) y la complejidad celular (SS Lin), y células que fueran positivas a los marcadores de cada fluoróforo, para llevar a cabo la compensación de los espectros de absorción y emisión.

#### **III.4.9.2 Fenotipado de las rADSCs**

Para completar y confirmar la caracterización de las células madre aisladas de la fracción vascular estromal de tejido adiposo (ADSCs), fue necesario comprobar si cumplían los criterios mínimos de expresión/no expresión de determinados marcadores celulares de superficie, establecidos formalmente por el Comité pertinente de la “International Society of Cellular Therapy (ISCT)” (Dominici *et al.*, 2006). Para ratas se aplicó un procedimiento parecido al de humanos. Así, las rADSCs deberían expresar positivamente los marcadores CD90.1 y CD29, y no presentar los marcadores hematopoyéticos CD11b, CD34 y CD45.

Se aplicó un procedimiento de inmunofluorescencia, usando la técnica de citometría de flujo. Previamente, se optimizaron los voltajes y se procedió a la compensación de fluoróforos en el citómetro de flujo empleado. Se disponen dos alícuotas de suspensión celular, cada una de ellas conteniendo  $1 \times 10^6$  células. Se centrifugó a 300 xg, a 4°C, durante 10 min. Después de aspirar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 100 µl de tampón de enjuague. A continuación, las células se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos para detectar los marcadores de superficie. Se añadió sólo a la alícuota 1 (la alícuota 2 sirve como blanco de referencia) 10 µl anti-CD90.1-FITC (Miltenyi Biotec), anti-CD29-APC (Miltenyi Biotec), anti-CD34-PE (SantaCruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), anti-CD45-PE (BD Pharmingen, Dallas, TX, USA) y anti-CD11b-PE (Bio-Legend,

San Diego, CA, USA). Se incubó a 4°C, en oscuridad, durante 10-15 min. Se lavaba el precipitado con 1-2 ml de tampón de enjuague centrifugando a 300 xg durante 10 min. Se aspiró el sobrenadante, se lavó de nuevo con 500 µl de tampón de enjuague y se volvió a centrifugar. El centrifugado se resuspendió en un volumen adecuado (350-500 µl) del tampón de enjuague. Finalmente, se midió la intensidad de fluorescencia en un citómetro de flujo Beckman-Coulter Mod. FC-500, equipado con “CellQuest Pro-software”.

#### **III.4.9.3 Fenotipado de las hADSCs**

Se utilizó la técnica de citometría de flujo y un kit (MSCs Phenotyping Kit human, MiltenyiBiotec) que contiene los anticuerpos y los fluoróforos necesarios para poder llevar a cabo la determinación citométrica.

##### **Composición del Kit:**

##### **Cocktail para fenotipado de MSCs humanas:**

Anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos: CD14-PerCP, CD20-PerCP, CD34-PerCP, CD45-PerCP, CD73-APC, CD90-FITC y CD105-PE.

##### **Cocktail control Isotópico humano:**

Anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos: Mouse IgG1-FITC, Mouse IgG1-PE, Mouse IgG1-APC, Mouse IgG1-PerCP, Mouse IgG2a-PerCP.

Se tomaron dos alícuotas, cada uno con un máximo de  $1 \times 10^6$  células. A continuación, se centrifugó la suspensión celular a 300 xg durante 10 min, aspirando el sobrenadante. Se resuspendió cada alícuota con 100 µl de tampón de enjuague y se añadió 10 µl de cocktail para fenotipado de MSCs humanas en la alícuota 1, y 10 µl de cocktail de control isotópico humano en la alícuota 2. Se mezcló bien cada alícuota, y se dejó incubar durante 10 min, en oscuridad, a 4°C. Finalmente, se lavó añadiendo 1-2 ml de tampón de enjuague. Se centrifugó a 300 xg durante 10 min, aspirando el sobrenadante. Se resuspendió en 500 µl de tampón de enjuague y la muestra ya estuvo lista para ser medida en el citómetro de flujo.

#### **III.4.10 Pruebas de Multipotencialidad**

Para caracterizar una célula madre mesenquimal, de acuerdo con el Comité especializado de la “International Society of Cellular Therapy (ISCT)”, es necesario que:

- a) Sea adherente al plástico.
- b) Exprese en el fenotipado determinados marcadores de superficie celular (antígenos), y no exprese otros.
- c) Presente multipotencialidad, es decir, capacidad para diferenciarse, al menos, hasta adipocitos y osteoblastos, aunque también a condrocitos.

Hay factores que influyen en el potencial de diferenciación, como por ejemplo, el grado de homogeneidad alcanzado en la población celular después de sucesivos pases y la densidad celular en cultivo.

### **III.4.11 Diferenciación celular hasta adipocitos de las rADSCs<sup>3</sup>**

#### **III.4.11.1 Desarrollo**

En una placa de 24 pocillos se incubaron  $3,7 \times 10^4$  células/ml para un volumen final de 1 ml con el medio StemXVivo Media (R&D System, Minneapolis, MI, USA). Se procedió al cultivo, en el incubador a 37°C, reemplazando el medio cuidadosamente cada 2-3 días.

Una vez alcanzado el 100% de confluencia, lo que sucedía en 2-4 días, se eliminó el medio StemXVivo media (R&D System, Minneapolis, MI, USA), que se sustituía por el medio de inducción adipogénica (5 ml de StemXVivo Media más 50 µl de suplementos adipogénicos contenidos en el Kit). Se cultivó en las mismas condiciones anteriores, durante 10-14 días, renovando el medio cada 2-3 días. Los adipocitos diferenciados no proliferan, puesto que reservan toda su energía para acumular lípidos. Tras eliminar el medio de mantenimiento se lavaron las células con 2x2 ml de PBS, para eliminar el medio residual. Luego, se adicionó 1 ml de metanol a temperatura ambiente durante 5 min, que actúa como deshidratante, y fija las células. Una vez eliminado el metanol residual, se procedió a la detección de los adipocitos.

#### **III.4.11.2 Detección**

Una vez completada la diferenciación celular hasta adipocitos se procedió a la detección de los mismos. Los adipocitos formados eran más o menos redondeados, y presentaron vacuolas lipídicas. Previamente, se preparó una disolución matriz del reactivo Oil Red O (colorante lipofílico) (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) al 0,5 % p/v, en alcohol isopropílico. Disoluciones para el experimento de detección se prepararon por dilución de 6

---

<sup>3</sup> En los “experimentos para distintas edades”, así como en el “efecto del CH *in vivo*”, los medios de diferenciación se diluyeron ¼ con StemXVivo.

ml de la disolución matriz con 4 ml de agua desionizada, con lo que la concentración final fue del 0,3 % p/v. Inmediatamente antes de utilizarlo, el reactivo se pasó a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Se añadieron 2 ml de Oil Red O al 0,3 % p/v a los pocillos de la placa, agitando con agitador orbital, a baja velocidad, durante 20 min. Una vez aspirado el exceso de reactivo de tinción, se lavó con 2x2 ml de agua bidestilada. La diferenciación hasta adipocitos se manifestó por observación al microscopio de fase invertida de las vacuolas teñidas de rojo.

#### **III.4.11.3 Cuantificación**

Se realizó mediante conteo en una placa paralela (adipocitos sin teñir). En los pocillos de una placa de 24 pocillos se trazaron líneas diagonales, y se hizo el recuento en 5 secciones aleatorias a lo largo de ese trazo evitando las zonas cercanas a los extremos con un objetivo de 20x en un microscopio de fase invertida.

#### **III.4.12 Diferenciación celular hasta adipocitos de las hADSCs**

##### **III.4.12.1 Desarrollo**

Se llevó a cabo con el mismo procedimiento empleado para rADSCs. En este caso se incubaron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/ml, en placas de 6 pocillos, y además se usó un medio de diferenciación para células humanas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Se cambiaba el medio cada 3 días, y en torno al día 21 se realizó la detección.

##### **III.4.12.2 Detección**

Se empleó idéntico procedimiento que el descrito para rADSCs

##### **III.4.12.3 Cuantificación**

Para cuantificar la diferenciación a adipocitos en hADSCs se cultivaron las células como aparece descrito en el Apartado III.4.11.1 y se homogenizaron las células como se describen en el Apartado III.4.18.2, realizando una inmunodetección mediante Western Blot (WB) de la proteína GPDH, cuya presencia y actividad enzimática se encuentra elevada en adipocitos (Adams *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 2008, Ortiz-Colón *et al.*, 2009).

### III.4.13 Diferenciación celular hasta osteoblastos de las rADSCs<sup>4</sup>

#### III.4.13.1 Desarrollo

La suspensión celular se dispuso en los pocillos de una placa de 24 pocillos, a una densidad celular de  $7,4 \times 10^3$  células/pocillo con medio StemXVivo Media (R&D System, Minneapolis, MI, USA). Se introdujeron las placas en el incubador, a 37°C.

Cuando se alcanzó el 50-70% de confluencia, lo que sucedía en 2-3 días, se eliminó el medio StemXVivo, que se sustituyó por el medio de diferenciación osteogénica (5 mL de StemXVivo Media más 250 µL de suplementos osteogénicos contenidos en el Kit). Se mantuvo el proceso de inducción a la osteogénesis durante 14-21 días, renovando el medio cada 3-4 días. Tras eliminar el medio de diferenciación osteogénica se lavaron las células con 2x2 ml de PBS, para eliminar el medio residual. Luego, se adicionó 1 ml de metanol previamente enfriado a -20°C durante 5 min. Se eliminó el metanol residual con agua bidestilada, se eliminó el agua, y se procedió a la detección de osteoblastos.

#### III.4.13.2 Detección

Los osteoblastos se pre-identifican morfológicamente al microscopio por su apariencia de tipo cuboidal. Previamente se preparó el reactivo de detección de los osteoblastos. Para ello se disolvió una tableta de SIGMA FAST BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) en 10 ml de agua bidestilada, agitando hasta su disolución.

Se añadió 1 ml de este reactivo de tinción de sustratos cromogénicos a las células tras la fijación con metanol, a temperatura ambiente, agitando lentamente durante 10 min. Se aspiraba el colorante en exceso, se lavó con 2 ml de agua bidestilada y se aspiró el agua, pero con el cuidado de dejar las células humedecidas. Finalmente, las células teñidas se examinaron al microscopio de fase invertida.

NBT (sal de tetrazolio) se reduce durante la prueba, originando un precipitado azul-púrpura, insoluble en agua. BCIP sufre una hidrólisis enzimática, en presencia de la fosfatasa alcalina, originando un precipitado azul-púrpura. La cantidad de precipitado coloreado formado aumenta linealmente con el número de osteoblastos.

---

<sup>4</sup> En los “experimentos para distintas edades”, así como en el “efecto del CH *in vivo*”, los medios de diferenciación se diluyeron ½ con StemXVivo.

### **III.4.13.3 Cuantificación**

Para cuantificar la diferenciación a osteoblastos, tanto de hADSCs como de rADSCs, se cultivaron las células como se describió en el Apartado III.4.12.1. Tras confirmar la diferenciación, se eliminó el medio de cultivo diferenciador y se lavó con PBS dos veces, se añadieron 500 µl de HCl 0,6 N y se incubó a 37°C toda la noche. Las disoluciones fueron centrifugadas a 2000 xg durante 5 min. Se cuantificó el calcio a través de un ensayo colorimétrico que se basa en la unión del Ca libre al reactivo fenolsulfenofaleina (Quantichrom calcium assay Kit, BioAssay System, Hayward, CA, USA) formando un complejo estable de color azul y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 610 nm en un lector de placas.

### **III.4.14 Diferenciación celular hasta osteoblastos de las hADSCs**

#### **III.4.14.1 Desarrollo**

Se llevó a cabo con el mismo procedimiento empleado para rADSCs. En este caso, se incubaron a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/ml, en placas de 6 pocillos, y además se usó un medio de diferenciación para células humanas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Se cambiaba el medio cada 3 días, y en torno al día 10 se realizó la detección.

#### **III.4.14.2 Detección**

Se empleó idéntico procedimiento que el descrito para rADSCs.

#### **III.4.14.3 Cuantificación**

Para cuantificar la diferenciación hasta osteoblastos de las células hADSCs se cultivaron tal como se describe en el Apartado III.4.13.1 y, posteriormente, se sigue el mismo protocolo que el descrito para la cuantificación de los osteoblastos en el Apartado III.4.12.3.

### **III.4.15 Diferenciación celular hasta condroblastos de las rADSCs**

#### **III.4.15.1 Desarrollo**

Se cultivaron a 37°C,  $2,5 \times 10^5$  células rADSCs en un tubo cónico de 15 ml, cubriéndolas con 0,5 ml de medio diferenciador de condrocitos StemXVivo media (DMEM/F-12 más suplementos condrogénicos contenidos en el Kit). Los tubos se introdujeron en el incubador con la rosca del tapón abierta. El medio se cambia cada 2-3 días. Se evitó que el sedimento se fijara en el fondo, formándose como consecuencia de ello

nódulos esféricos de condroblastos. Tras 21 días de diferenciación, los nódulos se fijaron con paraformaldehído y se prepararon para la criodisección.

#### **III.4.15.2 Detección**

Los nódulos esféricos se lavaron con 1 ml de PBS, y luego se fijaron con 0,3 ml de paraformaldehído al 4% durante 1-2 h. Se volvieron a lavar con PBS, y se sometieron a congelación (-80°C) con isopentano. Se llevaron a cabo cortes de 5-10  $\mu\text{m}$  empleando el criostato. Se procedió a una inmunofluorescencia, por el procedimiento indicado más adelante en el Apartado III.4.22, haciendo uso del anticuerpo primario anti-Aggrecan (RyD System), y como anticuerpo secundario anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Las muestras se observaron al microscopio confocal ZEISS LSM7.

#### **III.4.16 Supervivencia de las ADSCs frente al estrés oxidativo provocado *in vitro* con hidroperóxido de cumeno (CH) y menadiona (MD)**

Para evaluar la resistencia de las ADSCs frente al estrés oxidativo se trató con distintas concentraciones (10-120  $\mu\text{M}$ ) de CH (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA), un reactivo comúnmente empleado como modelo de estrés oxidativo en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Ayala *et al.*, 1996; Arguelles *et al.*, 2006) y también con distintas concentraciones (5-80  $\mu\text{M}$ ) de MD (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA).

Las células rADSCs se criopreservaron mediante el procedimiento descrito en el Apartado III.4.6, empleando como agente crioprotector DMSO (5%, 10%, 20% v/v) y se descongelaron como viene descrito en el Apartado III.4.7. Las células descongeladas se cultivaron en frascos T75 durante el tiempo suficiente para alcanzar el 80% de confluencia, lo que se lograba en 24-48 h.

Para llevar a cabo los ensayos de viabilidad y citotoxicidad, la suspensión celular se dispuso en placas de 96 pocillos, a una densidad celular de  $1,5 \times 10^4$  células/pocillos en el medio de cultivo adecuado. Tras 12 h de incubación a 37°C, se retiró el medio de cultivo y se añadió 100  $\mu\text{l}$  de DMEM + 2% FBS y 100  $\mu\text{l}$  de disoluciones de distintas concentraciones de CH y MD preparadas en DMEM, a partir de una disolución matriz más concentrada. El tiempo de incubación con los agentes oxidantes fue de 3 h. Se reservaron pocillos en las placas para las condiciones de control “bajo” (sin agente oxidativo) y de control “alto” (células tratadas con disolución al 2% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) en DMEM). Transcurrido el tiempo establecido de reacción (3 h) se transfería 50  $\mu\text{l}$  del contenido de cada

pocillo a una nueva placa donde se iba a llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad. Se eliminó el volumen restante en la placa de 96 pocillos y las células fueron lavadas con PBS para realizar posteriormente en ella el ensayo de viabilidad.

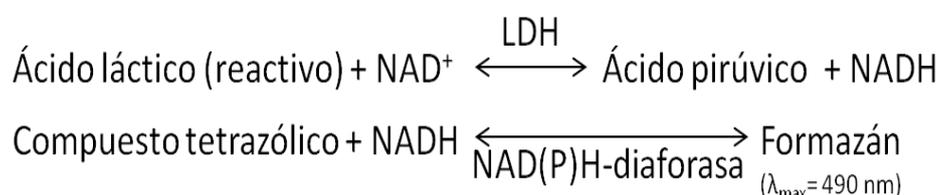
Para comprobar si la presencia de suero en el medio de congelación resultaba significativa para el grado de supervivencia celular tras la descongelación frente a situaciones de estrés oxidativo, se llevó a cabo un experimento, en las condiciones ya descritas, eligiendo una concentración óptima de agente crioprotector (DMSO al 10% v/v), y concentraciones de 7,5, 15, 30 y 60  $\mu\text{M}$  de CH. Los medios de criopreservación comparados fueron:

- DMEM + 20% FBS + 10% DMSO.
- 90% FBS + 10% DMSO.
- DMEM + 0% FBS (sin suero añadido) + 10% DMSO.

Usando el mismo procedimiento, se realizó un experimento para ver el efecto de la oxidación tras la descongelación comparándolo a diferentes tiempos. Las células se criopreservaron mediante procedimiento descrito en el Apartado III.4.6, empleando como agente crioprotector DMSO al 10% v/v y se descongelaron como viene descrito en el Apartado III.4.7. Un grupo se cultivó en frascos T75 durante el tiempo suficiente para alcanzar el 80% de confluencia, lo que se lograba en 24-48 h, y al otro grupo se mantuvo en cultivo hasta 2 semanas después de la descongelación con 3 pases ( $P_3$ ).

### III.4.17 Ensayo de citotoxicidad de las ADSCs

Este ensayo espectrofotométrico se fundamenta en la medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por las células dañadas, tras la rotura de la membrana celular. La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Se trata de una reacción acoplada donde el ácido láctico del reactivo Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany), da lugar a ácido pirúvico por la acción de LDH, a la par que el co-factor  $\text{NAD}^+$  se reduce hasta  $\text{NAD(P)H}$ . Este compuesto, en presencia de  $\text{NAD(P)H}$ -diaforasa, transforma la sal de tetrazolio del kit (INT) hasta formazán, compuesto coloreado anaranjado hidrosoluble (Chan *et al.*, 2013), cuya

absorbancia se midió después de 30 min iniciada la reacción. El porcentaje (%) de citotoxicidad, que se calcula a través de la expresión:

$$Citotoxicidad (\%) = \frac{(A_{exp} - A_{control})}{(A_{Triton X-100} - A_{control})} \times 100$$

Donde,

$A_{exp}$  = Absorbancia a 490 nm experimental

$A_{control}$  = Absorbancia a 490 nm, sin CH (“Control bajo”)

$A_{Triton X-100}$  = Absorbancia a 490 nm, con Triton X-100 (0% de viabilidad, “Control alto”).

### III.4.18 Ensayo de viabilidad de las ADSCs

Este método colorimétrico se fundamenta en la medición de la actividad metabólica de las deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas (células vivas o viables), que actúan sobre el reactivo, contenido en el Kit CellTiter 96<sup>®</sup>, 3-(4,5)-dimetiltiazol-2-11)-5-(3-metoximetilfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) (Promega, Madison, WI, USA), que va acompañado de otro reactivo de acoplamiento de electrones (metasulfato de fenazina, PMS). En la reacción se origina formazán, que presenta un máximo de absorción a 490 nm (Cory *et al.*, 1991; Vistica *et al.*, 1991; Goodwin *et al.*, 1995).

En los pocillos de la placa de 96 pocillos, se eliminaba el medio donde se han realizado los diferentes tratamientos (véase III.4.16), y se añadían 120 µl del medio de reacción (1920 µl MTS/PMS + 9600 µl DMEM). Se incubaron a 37°C en oscuridad, durante 1 h. Si pasada la hora no se lograra una absorbancia estable a 490 nm, se deja estabilizar durante 2-3, y hasta 4 h. La  $A_{490}$  se mide directamente con el lector de placas. Las lecturas de absorbancia son directamente proporcionales al número de células viables en el cultivo y, por tanto, al porcentaje (%) de viabilidad o supervivencia celular. Para ello se aplica la siguiente expresión:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{(A_{\text{exp}} - A_{\text{Triton X-100}})}{(A_{\text{control}} - A_{\text{Triton X-100}})} \times 100$$

Donde,

$A_{\text{exp}}$  = Absorbancia a 490 nm experimental

$A_{\text{control}}$  = Absorbancia a 490 nm, sin CH (“Control bajo”)

$A_{\text{Triton X-100}}$  = Absorbancia a 490 nm, con Triton X-100 (0% de viabilidad, “Control alto”).

### **III.4.19 Aislamiento y cuantificación de proteínas solubles citoplasmáticas**

#### **III.4.19.1 Obtención a partir de tejido hepático**

Los hígados obtenidos de los animales se procesaron en frío, cortado en pequeños trozos y realizando varios lavados con tampón HEPES para eliminar la máxima cantidad de sangre. Por cada gramo de tejido se añadió 5 ml de tampón HEPES, para determinación de la peroxidación lipídica, o tampón RIPA (150mM NaCl, 20mM TRIS Base, 1mM EGTA, 1% NP40, 2,5mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1mM EDTA y 1% Deoxycolato sódico), para realizar el ensayo Western Blot. Las muestras se homogenizaron durante 10 s con el homogenizador, realizando una primera centrifugación a 1800xg durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 20.000xg durante 15 min. Se almacenó el sobrenadante a -80°C, hasta la realización de otras pruebas.

#### **III.4.19.2 Obtención a partir de células madre**

Cuando el cultivo alcanzó la confluencia, se levantaron las células con tripsina, se centrifugó a 300xg durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS y se volvió a centrifugar a 300 xg durante 10 min, eliminando el sobrenadante. Luego, se añadió 100  $\mu\text{l}$  de tampón RIPA (que lisaba las células e inhibe a las proteasas) sonicando con 5 pulsos intermitentes al 60 % de la potencia del sonicador y centrifugando a 20.000xg durante 20 min. Se conservó el sobrenadante a -80°C, hasta la realización de otras determinaciones.

#### **III.4.19.3 Cuantificación**

##### **III.4.19.3.1 Ensayo de Lowry**

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Fryer *et al.*, (1986), que es una modificación del método original descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951) usando albúmina bovina como estándar.

### III.4.19.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)-Western Blot (WB)

Para la realización de la separación de las proteínas mediante electroforesis desnaturante se han utilizado geles de acrilamida al 10% para proteínas <40 KDa, y geles al 12% para proteínas >40KDa en un sistema de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los reactivos y volúmenes para la construcción de los geles son los mostrados en la Tabla 4.

El tampón de electroforesis fue 0,025 M Tris/CHI, 0,19 M Glicina y 0,1 % SDS. Las muestras, previamente a la electroforesis, se mezclaban con el tampón de carga (0,01 M Tris/HCl pH 6,8, 20 % Glicerol, 10% β-Mercaptoetanol, 2,3 % SDS, 0,005 % Azul de Bromofenol), llevándose a ebullición durante 5 min. Tras cargar las muestras en los pocillos de los geles, la electroforesis se llevó a cabo a 30 mA/gel de 1,5 mm.

**Tabla 4. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS.** Al cambiar de volumen de acrilamida, bis-acrilamida y agua podemos conseguir geles con acrilamida al 10 o al 12 %.

Reactivos	Gel de Separación		Gel de Empaquetamiento.
	Volumen Final 10 ml (1 gel; grosor 1,5mm)		Volumen Final 5ml
	Concentración de Acrilamida % (p/v)		
	10 %	12 %	3 %
Acrilamida (30%)	3,38 ml	4 ml	0,5 ml
Bis-acrilamida (1%)	1,32 ml	1,58 ml	0,5 ml
Tampón 1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	
Tampón 0,25 M Tris/HCl, 0,25 % SDS, pH 6,8			2,5 ml
APS	10 µl	10 µl	10 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
Agua	2,78 ml		1,5 ml

- **Ensayo Western-Blot (WB).**

Una vez terminada la electroforesis, transferimos las proteínas desde el gel hasta una membrana de nitrocelulosa. Para llevar a cabo la transferencia usamos el sistema TransBlot Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Como tampón de transferencia se usó 0,025 M Tris/CHL, 0,19 M Glicina y 20% Metanol y un voltaje de 100V durante 90 min. Tras la transferencia, se realizó la inmunodetección de las proteínas de interés mediante los anticuerpos específicos correspondientes (Tabla 5), usando el siguiente protocolo:

- Las membranas se tiñen con una solución reversible de Rojo Ponceau (0,2 % de Rojo Ponceau en 3 % de TCA), que nos indicará si la transferencia se ha llevado a cabo correctamente.
- A continuación se lavaron las membranas tres veces con TTBS (20mM Tris/CHL, 500 mM NaCL y 0,05 % de Tween 20) durante 15 min, con agitación.
- Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana se trató con leche de bloqueo (5% en TTBS) durante 1 h, a temperatura ambiente y agitación suave.
- Se volvían a realizar otros tres lavados con TTBS durante 15 min, con agitación, incubando las membranas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C.
- Al día siguiente, se realizaban otros tres lavados con TTBS.
- Se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (dilución 1/1000-1/3000) durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación suave.
- Por último, se realizaron tres lavados con TTBS.

Para la cuantificación, las proteínas fueron analizadas por densitometría utilizando el software MultiGauge (Fujimil, Tokio, Japan).

Tabla 5. Relación de anticuerpos empleados en WB y características más relevantes<sup>5</sup>

PROTEÍNA/ ANTIGENO DIANA	ESPECIE HUÉSPED		DILUCIÓN	BANDA RECONOCIDA	PROVEEDOR
	ANTICUERPO (clon/nomenclatura)				
AMPK $\alpha$	Conejo	Policlonal	1/1000	61 KDa	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
eEF2	Conejo	Policlonal	1/1000	95 KDa	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
GPDH	Conejo	Policlonal	1/1000	38 KDa	Sigma-Aldrich (Sant Louis, MO, USA)
GADPH	Ratón	Policlonal	1/3000	37 KDa	Sigma-Aldrich (Sant Louis, MO, USA)
Nanog	Conejo	Policlonal	1/500	28-36 KDa	Abnova (Taipei, Taiwan)
PGC1 $\alpha$	Conejo	Policlonal	1/500	130 KDa	RayBiotech (Norcross, GA, USA)
SIRT1	Conejo	Monoclonal	1/1000	120 KDa	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
Sox2	Conejo	Policlonal	1/500	35 KDa	Abnova (Taipei, Taiwan)
$\alpha$ Tubulina	Ratón	Policlonal	1/3000	52 KDa	Sigma-Aldrich (Sant Louis, MO, USA)

### III.4.20 Determinación de hidroperóxidos lipídicos por oxidación de Fe(II) en presencia de naranja de xilenol (método FOX)

Los hidroperóxidos lipídicos se determinaron siguiendo el método de Jiang *et al.*, (1991), aplicado para microplacas. El método se basa en la acción oxidante de los hidroperóxidos lipídicos, que oxidan Fe(II) a Fe(III) en medio ácido, y Fe(III) en presencia del reactivo naranja de xilenol forma un complejo coloreado. El reactivo FOX 10x se preparó de forma extemporánea, con sulfato ferroso 5 mM, naranja de xilenol 2 mM y sorbitol 2 M, disueltos en ácido sulfúrico 250 mM. Antes de añadirlo a las muestras, se obtenía el FOX 1x diluyéndolo en metanol.

Se añadieron 10  $\mu$ l de muestra a cada pocillo en una placa de 96 pocillos y 90  $\mu$ l de ácido sulfúrico 25 mM. Se dejó 30 min, y se añadieron 100  $\mu$ l del reactivo FOX 1x. Después de 45 min en oscuridad, se midió la absorbancia del complejo a 560 nm ( $\epsilon = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

<sup>5</sup> Los anticuerpos fueron diluidos en TTBS y 5 % de BSA y se conservan a 4°C para ser reutilizados.

cm<sup>-1</sup>). Los resultados se expresan como % de nmoles hidroperóxidos lipídicos por g de proteínas totales.

### **III.4.21 Transfección de los genes indicadores GFP-Luc en las rADSCs usando lentivirus y seguimiento por bioluminiscencia óptica.**

Para el seguimiento de las rADSCs administradas “*in vivo*” a las ratas, se usó un lentivirus portador del plásmido pSIN-Dual-Luciferasa-GFP2. Este plásmido es una derivación del pSIN-Dual al que se le ha introducido la luciferasa bajo control del promotor SFFV, manteniendo la GFP original bajo el promotor UBIQ. Las células infectadas con este virus expresan luciferasa de luciérnaga y GFP, actuando como genes indicadores. Los lentivirus contienen un RNA lineal monocatenario, replicándose a través de la formación por retrotranscripción de un DNA provisional, que se inserta de forma estable en el genoma de la célula diana. Por tanto, dependen de enzimas transcriptasas inversas para la retrotranscripción, y de integrasas para que su DNA sea insertado al azar en el genoma.

Para la realización del ensayo, se sembraron 40.000 células rADSCs en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Transcurridas 24 h, cada pocillo fue tratado con 2 ml de una disolución con 24 µl de polybrene (inductor de la transfección) + 70 µl de lentivirus con MOI =  $6 \times 10^6$  cel/ml, todo en un volumen final de 12 ml de medio DMEM + FBS (la concentración final de polybrene es de 2µg/ml). Tras 12 h, se les renovó el medio sin polybrene, ya que éste puede provocar toxicidad. Se cultivaron con medio de cultivo DMEM + 10% FBS + 1% Antibióticos a 37°C. Cuando se alcanzó la confluencia, las células se levantaron. Se procedió al recuento celular y se analizó por citometría de flujo el porcentaje (%) de células GFP<sup>+</sup>.

#### **III.4.21.1 Seguimiento de la bioluminiscencia *in vitro***

Las imágenes de bioluminiscencia óptica se tomaron con una cámara CCD (IVIS Lumina II, Xenogen Corp.). La bioluminiscencia se cuantificó en unidades de fotones x segundos<sup>-1</sup> x centímetros<sup>-2</sup> x estereorradianes<sup>-1</sup> (p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Las células, cultivadas en un frasco T25 fueron sometidas posteriormente a las pruebas de actividad de la enzima Luciferasa, administrando 0,3 ml de D-Luciferina (Caliper, Hopkinton, MA, USA) (3 mg/ml) y tomando imágenes durante 10 s de exposición, antes y después de la administración, para confirmar que no existe autoluminiscencia previa.

#### **III.4.21.2 Seguimiento de la bioluminiscencia *in vivo***

Las imágenes de bioluminiscencia óptica se tomaron determinados días después del trasplante de las células. Se usó una cámara CCD (IVIS Lumina II, Xenogen Corp.). Las ratas, previamente anestesiadas, recibieron, mediante inyección i.p., 250 mg/kg de d-luciferina (sustrato del gen indicador), disuelta en PBS. La zona de administración de las células ha sido descrita en el Apartado III.3.4.

#### **III.4.22 Perfusión, congelación y cortes histológicos.**

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral al 6% (vía intraperitoneal), y luego fijadas por perfusión transcardíaca con una disolución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato NaHPO<sub>4</sub> 0,1 M y 5% sacarosa (pH 7,4). Previamente a la fijación, se realizó un lavado del sistema circulatorio con disolución salina (NaCl al 0,9 %). Tras haber perfundido los cerebros e hígados, extraerlos y dejarlos un día en paraformaldehído, se procedió a introducirlos en los siguientes gradientes de sacarosa: 10%, 20% y 30%, progresivamente, hasta que descendieron al fondo del frasco. Posteriormente, se sumergieron en isopentano y fueron congelados a -80 °C. Después, se procedió a cortar los tejidos en el criostato a -20 °C. En el caso del tejido cerebral se realizaron los cortes siguiendo la referencia del Atlas de Paxinos y Watson. Se hicieron cortes coronales de 20 µm de espesor, que se conservaron a -20 °C hasta su uso.

#### **III.4.23 Inmunofluorescencia de células *in vitro***

Para realizar las inmunofluorescencias de las células en cultivo se siembran las células sobre cristales colocados en una placa de 24 pocillos. Se cultivan entre 25.000 y 50.000 células por pocillo. Cuando alcanzaron el 80% de confluencia se retiró el medio y los pocillos se lavaron dos veces con PBS. Se dispuso la placa a -20 °C durante 10 min y se añadió 1 ml de fijador (ácido acético al 5% en etanol) en frío, dejando a 4°C durante 20 min. Pasado este tiempo, se eliminó el agente fijador y se lavó 3 veces con PBS. Se incubó con disolución de bloqueo (PBS más 1% de Suero<sup>6</sup>) durante 1 h, a temperatura ambiente. Luego, se eliminó la disolución de bloqueo y se volvió a lavar 3 veces con PBS. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 6) a una dilución 1:100 – 1:1000 con 10% de suero y Tritón X-100 al 0,25%, a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavó 3 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario diluido 1:200 con Tritón X-100 al 0,25% y

---

<sup>6</sup> El suero para la disolución de bloqueo debería ser, siempre que fuera posible, el suero del animal en el que se formó el anticuerpo secundario.

Hoescht dilución 1:1000 en PBS, durante 1 h a 37 ° C. Se lavó 3 veces con PBS, y se montó con líquido de montaje para fluorescencia (DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Las muestras ya estaban disponibles para ser observadas al microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioskop40), o en microscopio confocal (ZEISS LSM7 DUO).

### III.4.24 Inmunofluorescencia en tejidos

Para llevar a cabo la inmunofluorescencia se procedió a colocar los portaobjetos con las secciones de cerebro, o los cortes de hígados, en el “hot plate” 30 min a 40 °C. Los cortes de cerebro fueron delimitados con un marcador hidrófobo (DAKO pen), y estabilizados durante 10 min. Se lavó con citrato sódico en cubeta de vidrio, colocando ésta en una jarra de plástico con agua sin que llegara a entrar ésta en la cubeta. Todo esto fue calentado en microondas a 500 W, 2 veces 4 min, reemplazando tanto el citrato como el agua para enfriar. Seguidamente, fueron lavados con PBS 3 veces durante 10 min. Se escurrieron y secaron los bordes de los cortes con papel de filtro, y se dispusieron en la cámara húmeda con suero<sup>6</sup> al 1% en PBS. Se incubó el anticuerpo primario 1:100-1:1000 (Tabla 6) con suero al 1% y Tritón X-100 al 0,25% en PBS, en la cámara húmeda y se dejó actuar en la cámara fría (-4°C) toda la noche. Al día siguiente, los portaobjetos fueron escurridos y lavados 3 veces con PBS unos 10 min. Se aplicó el anticuerpo secundario a una concentración de 1:200 en PBS con Tritón-X-100 al 0.25% y Hoechst 1:1000. Se incubó 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS, y se montó con líquido de montaje para fluorescencia (DAKO). Las muestras ya estaban disponibles para ser observadas al microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioskop40), o al microscopio confocal (ZEISS LSM7 DUO).

**Tabla 6. Relación de anticuerpos empleados en inmunfluorescencia**

PROTEÍNA/ANTIGENO DIANA	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN	PROVEEDOR
	ANTICUERPO (clon/nomenclatura)		
ASGPR1/2	Conejo	1/200	SantaCruz (Dallas, TX, USA)
	Policlonal		
GFP	Conejo	1/500	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
	Monoclonal		
Iba1	Conejo	1/200	Wako (Wakayama, Japan)
	Policlonal		
Luc	Ratón	1/500	Sigma-Aldrich (Sant Louis, MO, USA)
	Policlonal		
Luc	Conejo	1/500	Sigma-Aldrich (Sant Louis, MO, USA)
	Policlonal		
NeuN	Ratón	1/1000	Millipore (Merck, Darmstadt, Germany)
	Monoclonal		
TH	Conejo	1/300	Sigma-Aldrich (Sant Louis, MO, USA)
	Monoclonal		

<b>Anti-Conejo AlexaFluor 488</b>	Cabra	1/200	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
	Policlonal		
<b>Anti-Raton Texas Red</b>	Caballo	1/200	Dako (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
	Policlonal		

### III.4.25 Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo la Inmunohistoquímica se procedió a colocar los portaobjetos con las secciones de cerebro en “hot plate” 30 min a 40 °C. Los cortes de cerebro fueron delimitados con un marcador hidrófobo (DAKO pen) y se dejó estar unos 10 min. Se lavó con citrato sódico en cubeta de vidrio, colocando ésta en una jarra de plástico con agua sin que llegara a entrar ésta en la cubeta. Todo esto fue calentado en microondas a 500 W, 2 veces 4 min, reemplazando tanto el citrato como el agua para enfriar. Seguidamente, se lavó 3 veces con PBS unos 10 min. Se empleó una disolución de inactivación de peroxidasa endógena, 2 ml de agua oxigenada al 30%, y 200 ml metanol durante 15 min. Después de haber lavado 2 veces con PBS unos 10 min, se escurrieron y secaron los bordes de los cortes con papel de filtro y se colocaron en la cámara húmeda con suero de caballo (Dako) para la inmunohistoquímica de tirosín-hidroxilasa (TH), y suero de cabra (Dako) para la inmunohistoquímica de OX-6 al 1% en PBS.

Se empleó como anticuerpo primario anti-Tirosina hidroxilasa (TH) (1:300), en suero de caballo al 1% en PBS y Tritón-X-100 al 0,25%; o anti-OX-6 (1:200) en suero de cabra al 1 % en PBS y Tritón-X-100 al 0,25%. En la cámara húmeda se dejó actuar en frío (-4°C) durante toda la noche. Al día siguiente, los portaobjetos fueron escurridos y lavados 3 veces con PBS 10 min. Se aplicó el anticuerpo secundario: anti-conejo biotinilado, a una concentración de 1:200, en el caso de TH, o bien anti-ratón biotinilado, en el caso de OX-6, en PBS con Tritón-X-100 al 0,25 % e incubado 2 h a temperatura ambiente, y lavado después 3 veces con PBS unos 10 min. A continuación, se procedió a incubar el tejido con el kit ABC: disolución ABC con 1% de sol A + 1% de sol B + 98% de TBS durante 1 h. Se escurrieron y lavaron nuevamente con PBS 10 min. Para el revelado se utilizó la disolución DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (dilución 1:1000, en DAB) y se lavó 2 veces con PBS 10 min. Para deshidratar los cortes se procedió a sumergirlos en los siguientes gradientes de alcohol: EtOH 50%, 70%, 90% y 100%, 10 min en cada uno, e histolemon, dos veces 8 min. Para el montaje se añadió DPX y se dejó secar 48 h hasta su posterior observación al microscopio (Olympus BX61).

### III.4.26 Análisis estereológico

#### III.4.26.1 Análisis de los datos inmunohistoquímicos para OX-6

Para la confirmación de la activación microglial se usó el software Analisys Imaging (Soft Imaging System GMBH, Münster, Germany) acoplado a una cámara Polaroid DMC (Polaroid, Cambridge, MA) incorporada a un microscopio óptico Leika (Leika Mikroskopie, Wetzlar, Alemania). Las células que mostraron inmunorreactividad al OX-6 se contaron usando 5 secciones por animal, sistemáticamente distribuidas a través del eje antero-posterior de la SN. En cada sección se muestreó un área ocupada por las células OX-6 positivas, dividida en 5 campos elegidos aleatoriamente. El conteo de dichas células se limitaba a una rejilla de dimensiones conocidas ( $40 \times 25 \mu\text{m} = 1000 \mu\text{m}^2$ ), superpuesta sobre la sección del tejido a cortar, bajo el objetivo de 40x. Los distintos tipos de células OX-6 positivas (dependiendo de su estado de activación poseen diversas formas) fueron contadas como un único tipo y expresadas como células/mm<sup>2</sup>.

#### III.4.26.2 Análisis de los datos inmunohistoquímicos para TH

El número de neuronas en la sustancia nigra (SN) fue estimado usando el diseño de muestreo fraccionado (Gundersen *et al.*, 1988). El conteo de neuronas TH positivas por sección se realizó a intervalos regulares, con unas medidas predeterminadas ( $x = 150 \mu\text{m}$ .  $y = 200 \mu\text{m}$ ). El muestreo sistemático de área ocupada por la SN se inició a partir de un corte aleatorio. En el punto de recuento se superpuso una rejilla de área conocida ( $40 \times 25 \mu\text{m} = 1000 \mu\text{m}^2$ ) que se usó con el objetivo de 40x. Así pues, la fracción de cada área de muestreo para cada una de las secciones era de  $1.000/(150 \times 200) = 0.033 \mu\text{m}^2$ . El eje Z de cada sección se normalizó, por tanto el grosor de la fracción muestreada fue de 1. En todos los animales, secciones de  $20 \mu\text{m}$ , separadas entre sí  $100 \mu\text{m}$ , fueron analizadas; por tanto, el porcentaje de muestras analizadas fue de  $20/100 = 0.20$ , o sea 20%. El número de neuronas de la SN se calculó multiplicando el número de neuronas contadas dentro de la región de conteo por la inversa de la fracción del área de muestreo y la inversa del total de las secciones contadas. Para ello se usó el software CAST (Olympus) en un microscopio Olympus BX61.

### III.4.27 Análisis estadístico

Las diferentes pruebas estadísticas se han llevado a cabo utilizando el software IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, NY, USA). Todos los análisis han sido considerados como pruebas paramétricas, puesto que cumplían los criterios de normalidad confirmadas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para las muestras analizadas mediante correlaciones

lineales se ha usado la prueba de Pearson. Para análisis estadísticos donde comparamos medias de datos cuantitativos se ha usado la prueba t de Student, para medias de dos grupos, y para pruebas de más de dos grupos se ha usado el test ANOVA de una cola, seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples, si la prueba de homogeneidad de las varianzas (o prueba de Levene) era nula. Si esta prueba no es nula, se asume que las varianzas no son homogéneas, y la comparación múltiple se realizaba usando el test de Games-Howell.

## **IV. RESULTADOS**



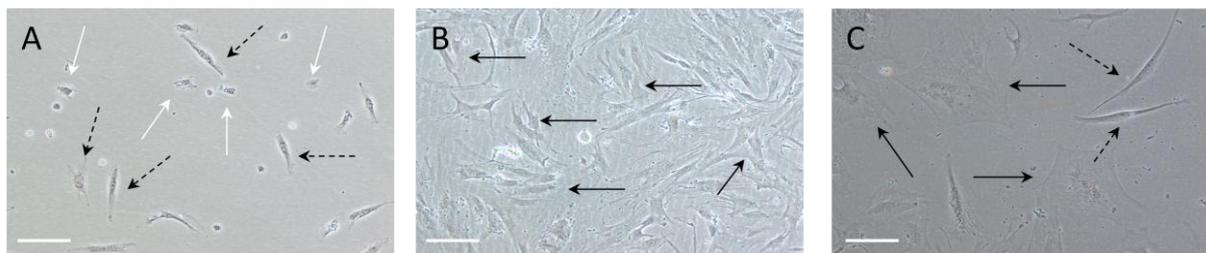
## **IV.1 CARACTERIZACIÓN DE CELULAS MADRE HUMANAS DE TEJIDO ADIPOSO (hADSCs) SEGÚN LAS NORMAS DE LA “INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY (ISCT)”**

### **IV.1.1 Adherencia**

Uno de los requisitos que deben cumplir, y el primero que exige la ISCT, es que las hADSCs sean células adherentes al plástico por sí mismas, sin necesidad de ningún aditivo que las ayude a anclarse a la superficie de material donde se cultiven (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006). En cuanto al método de aislamiento para obtenerlas no establece ninguna norma, encontrándose en la bibliografía diferentes métodos de aislamiento (Pountos *et al.*, 2007; Bunnell *et al.*, 2008; Baglioni *et al.*, 2009; Markarian *et al.*, 2014). En este trabajo se ha optado por el aislamiento inmunomagnético mediante tecnología MACS, usando el antígeno de superficie CD271(LNGFR) (Quirici *et al.*, 2002; Álvarez-Viejo *et al.*, 2015).

Las hADSCs, una vez aisladas y purificadas, emplearon entre 14 y 22 días para alcanzar el 80% de confluencia en una superficie de 25 cm<sup>2</sup>. Una vez alcanzada esta confluencia, y realizado el subcultivo consiguiente, la tasa de crecimiento aumenta, alcanzando el 80% de confluencia entre los 2 y 4 días, en superficies de 25 cm<sup>2</sup>, o entre 3 y 6 días, en superficies de 75 cm<sup>2</sup>. Esta variación se debe a que la densidad celular tras la separación magnética es muy baja, factor importante para que se produzca un buen crecimiento.

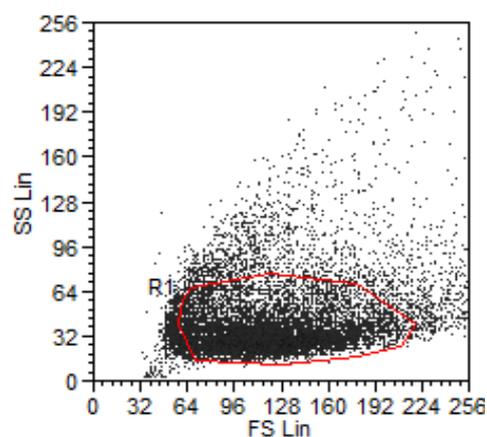
A lo largo del cultivo las células muestran una morfología fusiforme aunque aparecen también otras con morfología esférica de pequeño tamaño (Figura 12A). Conforme va pasando el tiempo y la confluencia va aumentando, las células van cambiando su morfología, agrandándose y aplanándose (Figura 12B). Después del tercer pase de un cultivo (Figura 12C), la morfología se muestra más homogénea y se acerca a la forma de los fibroblastos con plasticidad mesodermal, anticipando una alta potencialidad y expresión de CD73, CD90 y CD105 (Haasters *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2010).



**Figura 12. Morfología de las hADSCs en diferentes estadios del cultivo.** Las imágenes A, B y C fueron tomadas en microscopio invertido con un objetivo de 10x. La línea blanca inferior izquierda equivale a 100  $\mu\text{m}$ . La imagen A representa la visión de un cultivo de hADSCs 10 días después de la separación magnética. La imagen B, 20 días después, y la imagen C corresponde a cultivo con tres pases realizados ( $P_3$ ). Las flechas blancas indican células pequeñas y redondeadas, las flechas negras punteadas morfología fusiforme, y las flechas negras, células mas grandes y aplanadas.

### IV.1.2 Fenotipado

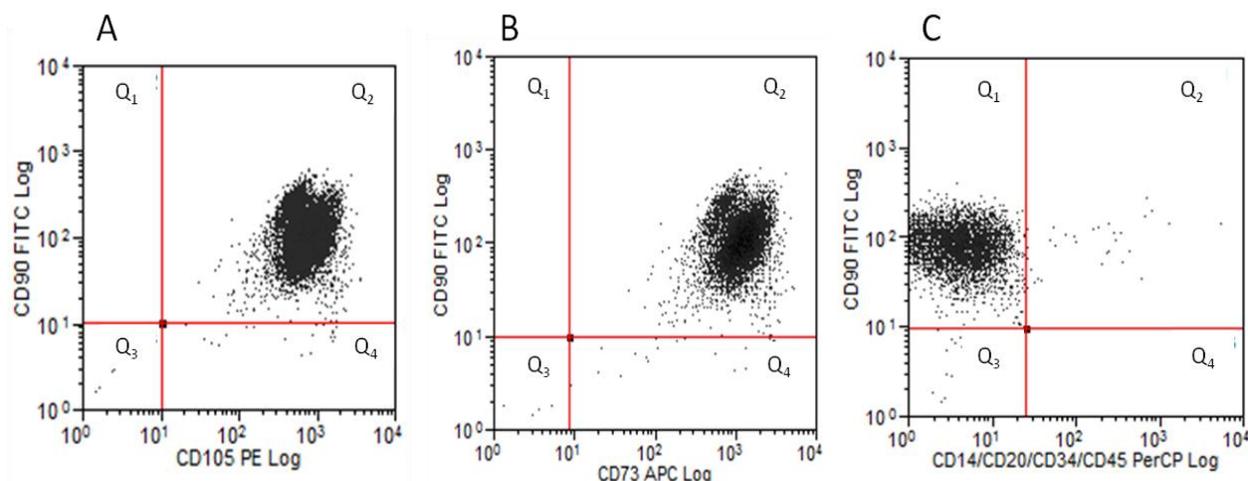
Para poder realizar el análisis citométrico necesitamos acotar la región donde se encuentran el mayor número de eventos. Para ello, representamos la complejidad celular frente al tamaño (Figura 13), y seleccionamos la region R1, que representa el 75% de los eventos totales analizados por el citómetro. La justificación de analizar esa área se debe a que es la zona donde se han registrado el mayor número de eventos, indicando por tanto donde se encuentra principalmente nuestra población celular, no encontrándose ni desplazada hacia la izquierda, (donde se encontrarían las células más pequeñas, probablemente células muertas), ni desplazada hacia



**Figura 13. Diagrama de dispersión de puntos.** Representación gráfica del tamaño celular (FS Lin) de las hADSCs frente a la complejidad celular (SS Lin). La región R1 acota la región que vamos a considerar para el análisis. Los valores del eje x y del eje y están representados como unidades relativas.

los mayores niveles del SS Lin, donde se encontrarían las células con una mayor complejidad (pudiéndose tratar de grumos celulares).

Los canales de emisión FL1, FL2, FL3 y FL4 están programados para excitar los fluoróforos FITC, PE, PerCP y APC, respectivamente, considerando los anticuerpos utilizados: CD14 PerCP, CD20 PerCP, CD34 PerCP, CD45 PerCP, CD73 APC, CD90 FITC y CD105PE. Las representaciones gráficas de dispersión de puntos, en las que enfrentamos los canales de emisión entre sí, FL1/FL2, FL1/FL4 y FL1/FL3, nos darán información sobre el número de eventos que expresan marcadores CD90 FITC/CD105 PE, CD90 FITC/CD73 APC y CD90 FITC/CD14CD20CD34CD45 PerCP (Figura 14).

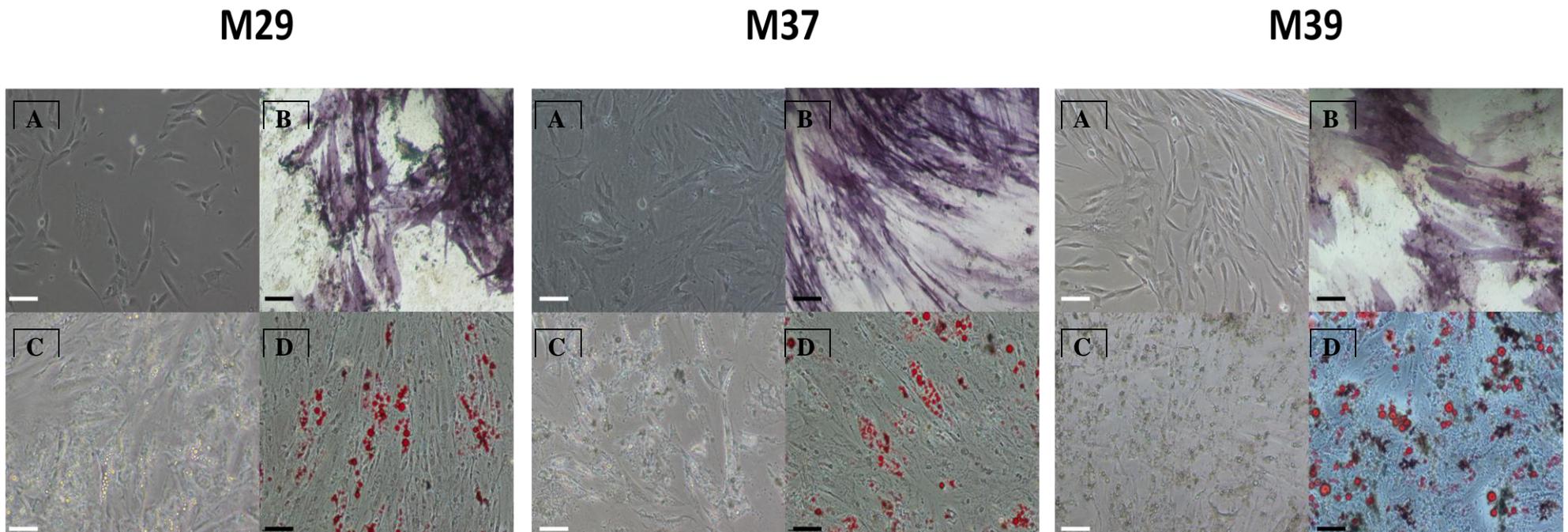


**Figura 14. Diagramas de dispersión de puntos de los canales de emisión. A:** Representación de los antígenos CD90 FITC frente a CD105 PE. **B:** CD90 FITC frente a CD73 APC. **C:** CD90 FITC frente a CD14CD20CD34CD45 PerCP. Las regiones Q indican la positividad o negatividad de los ejes x e y, Q<sub>1</sub> (-/+), Q<sub>2</sub> (+/+), Q<sub>3</sub> (-/-) y Q<sub>4</sub> (+/-).

En la Figura 14A se puede observar que la nube de puntos se concentra en la región Q<sub>2</sub>. El número de eventos en esa región es del 99,67 % positivo para la expresión de los marcadores antígenicos CD90 y CD105. En la Figura 14B volvemos a observar la nube de puntos en la misma región Q<sub>2</sub>, siendo en este caso un 99,69 % positivo a la expresión de los marcadores antígenicos CD90 y CD73. En la Figura 14C observamos los porcentajes positivos para los marcadores antígenicos CD14, CD20, CD34, CD45 (hematopoyéticos). En la región Q<sub>2</sub> es de un 0,32%, y en Q<sub>4</sub> de 0,11%, por lo que no existen células positivas a los marcadores antígenicos hematopoyéticos.

### IV.1.3 Multipotencialidad

Para finalizar la caracterización e identidad, la ISCT establece que, para considerarse MSCs, las hADSCs deben tener capacidad multipotente, es decir, que se diferencien en, al menos, dos tipos diferentes de células relacionadas con la estirpe mesengioblástica (Dominici *et al.*, 2006). Esa diferenciación puede conducir hasta adipocitos, osteoblastos o condroblastos. En la Figura 15 mostramos que en diferentes edades hemos obtenido diferenciación, tanto hasta osteoblastos como hasta adipocitos. Sin profundizar si existe una diferencia en la cuantificación de la diferenciación según la edad, podemos decir que todas las hADSCs obtenidas se han diferenciado hasta osteoblastos (Figura 15B) y hasta adipocitos (Figuras 15C y 15D). Podemos observar que la diferenciación hasta adipocitos se hace notable incluso antes de la tinción, debido a la morfología que adquieren las células en cultivo, con aspecto fusiforme y conteniendo vacuolas refringentes a la luz, que las hace muy características (Figura 15C).

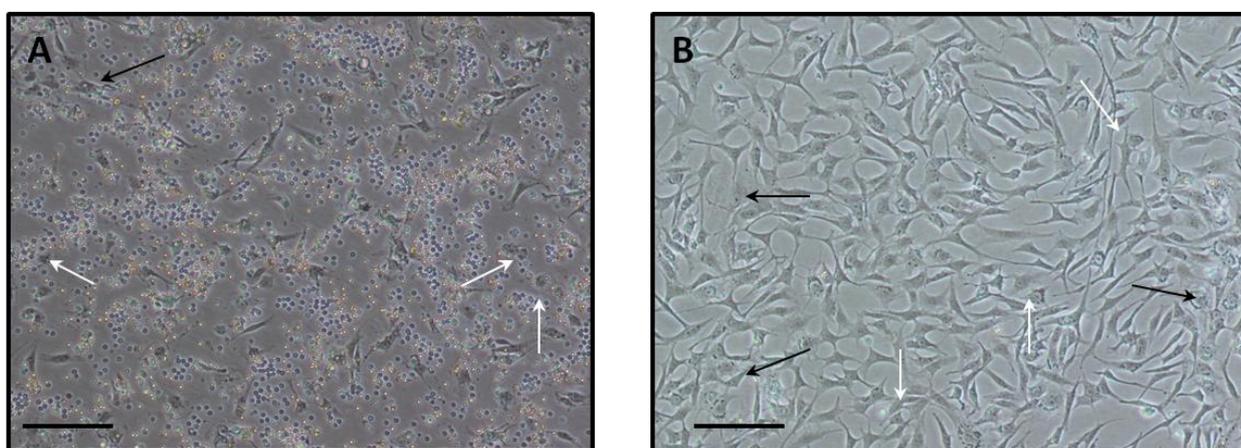


**Figura 15. Multipotencialidad de las hADSCs.** Imágenes tomadas a partir de tres muestras (M) de diferentes edades: 29 (M29), 37 (M37) y 39 (M39) años. **A:** Imágenes de las hADSCs antes de iniciar la diferenciación, tomadas con el objetivo 10x. **B:** Imágenes obtenidas tras la diferenciación hasta osteoblastos, y posterior tinción, tomadas con el objetivo 20x. **C:** Imágenes de hADSCs diferenciadas hasta adipocitos, tomadas con el objetivo 10x. **D:** Tinción de vacuolas lipídicas contenidas en los adipocitos, tomadas con el objetivo de 20x. Las barras blancas en el margen inferior izquierdo miden 100  $\mu\text{m}$ , y las barras negras 50  $\mu\text{m}$ .

## IV.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO DE RATA (rADSCs)

### IV.2.1 Adherencia

A diferencia de humanos, no existe aún un consenso generalizado sobre qué criterios deben reunir las rADSCs para ser consideradas MSCs. Son muchos los autores que intentan mimetizar los criterios, pero a veces no se cumplen de la misma manera, sobre todo a la hora de definir los antígenos de superficie (Pountos *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2014). Lo que sí se debe cumplir es que las rADSCs sean adherentes al plástico, diferenciarse, al menos, en dos tipos diferentes de células de la estirpe mesodérmica y expresar una serie de marcadores antigénicos de superficie. El método de aislamiento para obtenerlas tampoco sigue un criterio



**Figura 16. Morfología de las rADSCs.** Las imágenes A y B fueron tomadas en microscopio invertido con un objetivo de 10x. La línea negra inferior izquierda equivale a 100  $\mu\text{m}$ . **A:** Fotografía de un cultivo de SVF, 3 días después del cultivo. **B:** Fotografía de un cultivo de 3 días, tras separación mediante tecnología MACS. Las flechas blancas indican morfología pequeña y esférica, las flechas negras morfología grande y aplanada, y el resto de células tienen morfología fusiforme.

establecido. Existen diferentes métodos de aislamiento, siendo común la práctica de cultivar la fracción vascular estromal (SVF) (Freitas *et al.*, 2014). En nuestro caso además, hemos realizando una purificación mediante la tecnología MACS, usando el antígeno de superficie CD90.1, demostrando con ello obtener mejores resultados. Las rADSCs una vez aisladas y purificadas, alcanzan el 80% de confluencia en 7 días, en una superficie de 75  $\text{cm}^2$ . Una vez alcanzada esta confluencia, y realizados los subcultivos consiguientes, la tasa de crecimiento aumenta, alcanzando el 80% de confluencia entre los 2-4 días, en superficies de 75  $\text{cm}^2$ . En cuanto a la morfología, la mayoría de las células adquieren una forma fusiforme, aunque aparecen también otras con morfología esférica y de pequeño tamaño (Figura 16), siempre en menor proporción que en el caso de las hADSCs. Morfológicamente, la única diferencia entre un cultivo obtenido a partir de la SVF (Figura 16A), y otro aislado mediante tecnología

MACS (Figura 16B), es que en el caso de la SVF se observa cómo existen células en suspensión, que van desapareciendo a lo largo de los días.

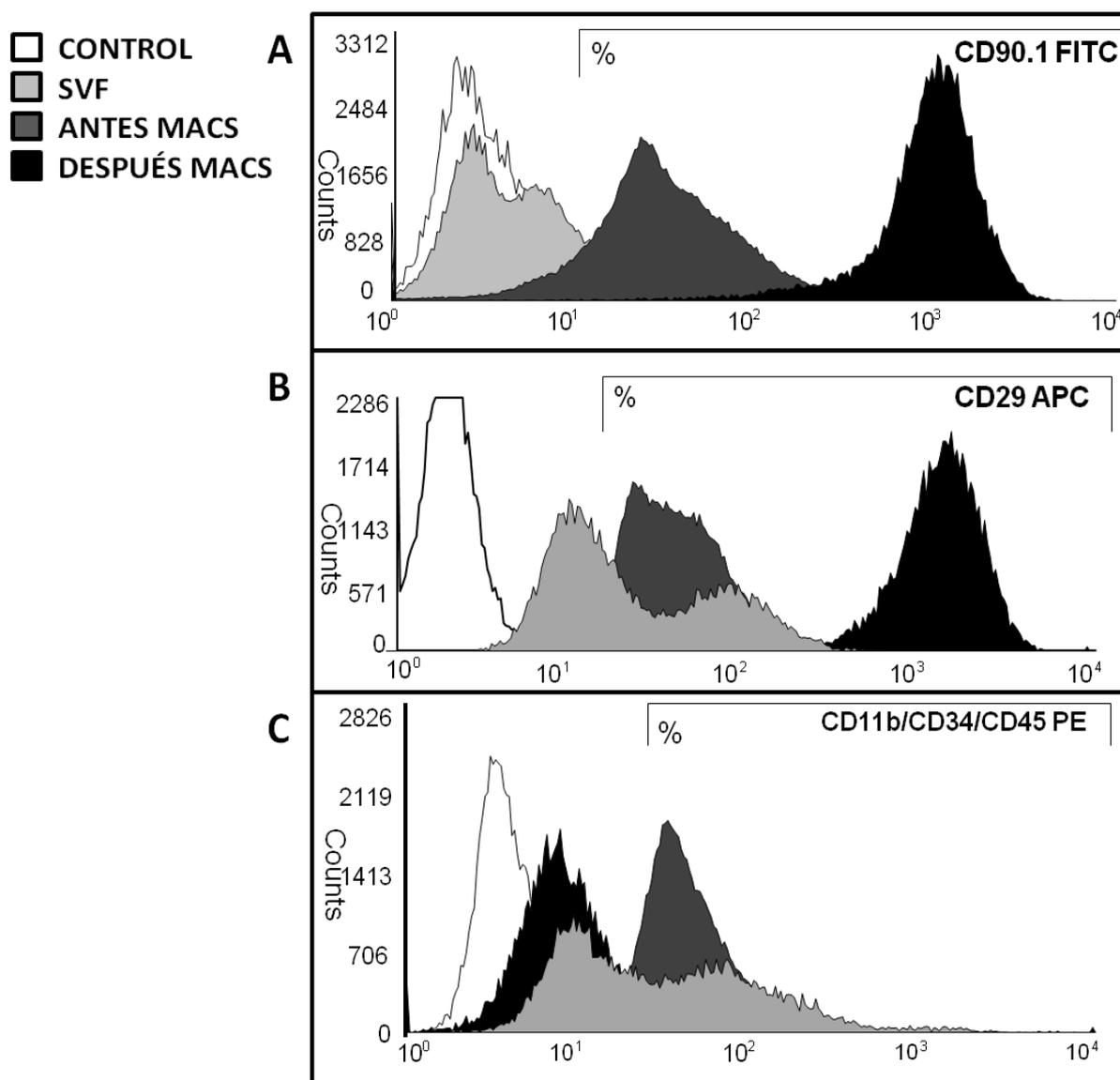
#### IV.2.2 Fenotipado

Previamente a la realización de la citometría de flujo, se establecieron los voltajes y compensaciones adecuadas. En este caso se usaron varios animales (N=3) para realizar un estudio fenotípico en los distintos estadios del aislamiento de las rADSCs. Los grupos se establecieron de la siguiente manera: grupo “Control”, que se refiere a células de morfología fusiforme, sin ningún fluoróforo; grupo “SVF”, que es la fracción vascular estromal obtenida justo después de la digestión con colagenasa, y pasada por los filtros; grupo “Antes-MACS”, que se refiere a las células cultivadas durante 3 días, a partir de la fracción vascular estromal; y grupo “Después-MACS” que se refiere a las células cultivadas durante 3 días después de su aislamiento inmunomagnético.

Tras añadir el cóctel de anticuerpos y analizar los datos obtenidos de la citometría de flujo, podemos decir, para el marcador de superficie CD90.1, que la muestra que presenta más intensidad de fluorescencia ( $\sim 10^3$ ) es el grupo “Después-MACS” (Figura 17A), con un porcentaje de positividad del  $99,0 \pm 0,9\%$  (Tabla 7). También, un elevado número de células son positivas para el grupo “Antes-MACS”,  $54,9 \pm 36,1\%$ , pero con mucha menor intensidad de fluorescencia ( $10^1-10^2$ ); de hecho, a pesar de esta diferencia no pudimos establecer diferencia significativa aparente (Tabla 7). El grupo “Después-MACS” sí es significativamente diferente, tanto del “Control” como del “SVF”, con porcentajes de positividad muy bajos (Tabla 7). Sin embargo, los grupos “Antes-MACS” y “SVF” son estadísticamente idénticos.

En cuanto a los datos obtenidos para el marcador de superficie CD29, se vuelve a repetir el mismo patrón. La muestra que más intensidad de fluorescencia ( $\sim 10^3$ ) presenta es el grupo “Después-MACS” (Figura 17A) con un porcentaje de positividad del  $99,1 \pm 1,4\%$  (Tabla 7), y el grupo “Antes-MACS”,  $67,5 \pm 40,0\%$  con mucha menos intensidad de fluorescencia ( $10^1-10^2$ ), no existiendo tampoco diferencia significativa entre sí. En esta ocasión, el grupo “Después-MACS” no es diferente del grupo “SVF”, con un porcentaje de  $47,2 \pm 29,3\%$  pero de intensidad de fluorescencia más baja. Además, los grupos “Antes-MACS” y “SVF” vuelven a ser estadísticamente idénticos e incluso “SVF” no se diferencia del grupo “Control”.

Por último, para los datos de los marcadores de superficie CD11b/CD34/CD45 se observa que son los grupos “Antes-MACS” y “SVF” los que mayor porcentajes de células positivas tienen,  $68,2 \pm 17,6\%$  y  $49,4 \pm 17,5\%$ , respectivamente, y no son significativamente diferentes entre sí, sí siéndolo con el resto de grupos (“Control” y “Después-MACS”). El grupo “Después-MACS” no es diferente estadísticamente ni siquiera del grupo “Control”, lo que indica una ausencia de marcadores hematopoyéticos, CD11b/CD34/CD45, aunque presente un 10,8% de positividad.



**Figura 17. Histogramas de fluorescencia de los canales de emisión.** Resultados obtenidos en citometría de flujo, con panel multicolor, donde se analizaron distintas muestras (N=3): Control, SVF, Antes-MACS y Después-MACS. **A:** Número de células positivas en % al antígeno CD90.1, en el canal de fluorescencia para FITC. **B:** Porcentaje de células positivas al antígeno CD29, en el canal de fluorescencia para APC y **C:** Porcentaje de células positivas a los antígenos CD11bCD34CD45, en el canal de fluorescencia para PE.

Por lo tanto podemos concluir que el único grupo que presenta positividad exclusivamente para los marcadores antigénicos, específicos de ADSCs, CD90.1 y CD29, y negatividad para los marcadores hematopoyéticos CD11b/CD34/CD45 es la muestra

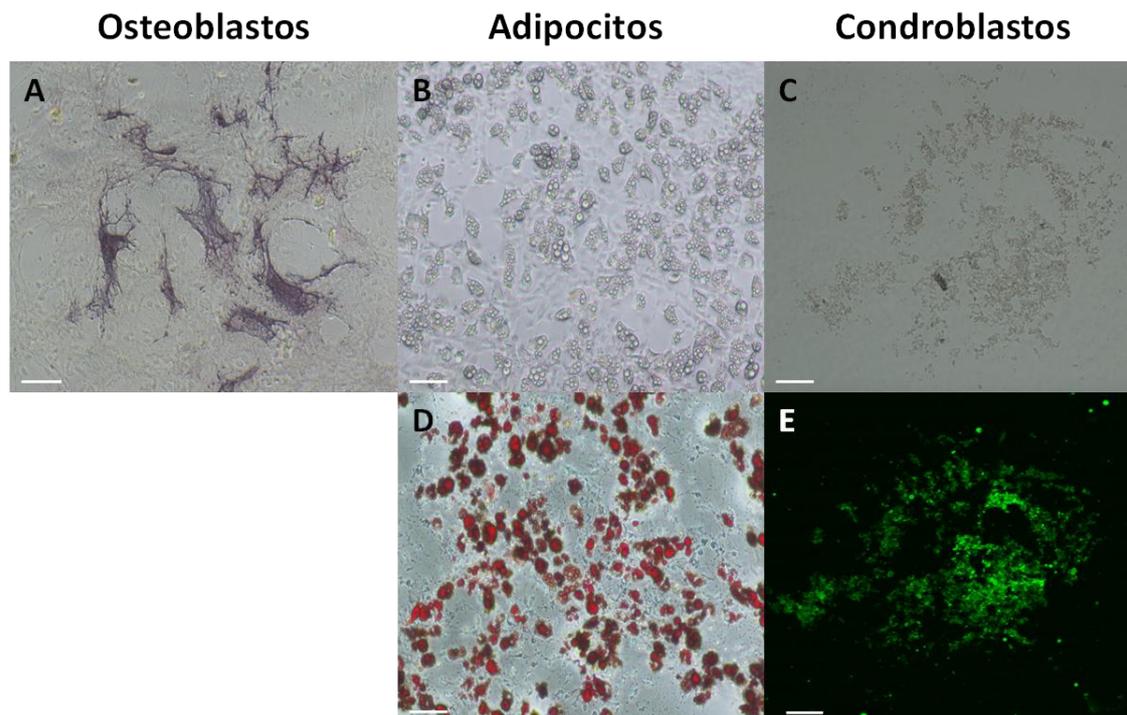
**Tabla 7. Resultado de los histogramas de fluorescencia de los canales de emisión.** Resultados representados como el porcentaje de la media  $\pm$  desviación estándar de los eventos positivos a cada antígeno de superficie, en cada muestra (N=3). \*Significativo (p=0,001). \*\*Significativo (p=0.008).

Grupos	CD90.1*	CD29**	CD11b/CD34/CD45*
<b>a. CONTROL</b>	3,4 $\pm$ 3,1 <sup>c,d</sup>	1,9 $\pm$ 3,0 <sup>c,d</sup>	0,8 $\pm$ 1,1 <sup>b,c</sup>
<b>b. SVF</b>	19,0 $\pm$ 9,3 <sup>d</sup>	47,2 $\pm$ 29,3	49,4 $\pm$ 17,5 <sup>a,d</sup>
<b>c. ANTES MACS</b>	54,9 $\pm$ 36,1 <sup>a</sup>	67,5 $\pm$ 40,0 <sup>a</sup>	68,2 $\pm$ 17,6 <sup>a,d</sup>
<b>d. DESPUES MACS</b>	99,0 $\pm$ 0,9 <sup>a,b</sup>	99,1 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	10,8 $\pm$ 3,1 <sup>b,c</sup>

“Después-MACS”. Los grupos “SVF” y “Antes-MACS” presentan positividad a los marcadores que deberían ser negativos; por tanto, este método de aislamiento no consigue una población homogénea de MSC. El hecho de que existan elevadas desviaciones estándares en los grupos “SVF” y “Antes-MACS” nos indica que el proceso de aislamiento es variable y origina oscilación del porcentaje de células que expresan esos marcadores. Cuando se realizó un aislamiento inmunomagnético hay un aumento evidente de la selectividad en el proceso, lo que viene indicado por valores más bajos de la desviación estándar (Tabla 7).

### IV.2.3 Multipotencialidad

Las rADSCs deben tener capacidad multipotente, es decir, que se diferencien en, al menos, dos tipos diferentes de células relacionadas con la estirpe mesangioblástica. Esa diferenciación puede conducir hasta adipocitos, osteoblastos o condroblastos. En la Figura 18 mostramos los resultados obtenidos de la diferenciación de las rADSCs hasta osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Sin profundizar si existe una diferencia en la cuantificación de la diferenciación, podemos decir que las rADSCs obtenidas se han diferenciado hasta osteoblastos (Figura 18A), adipocitos (Figuras 18B y 18D) y condroblastos (Figuras 18C y 18E). Incluso, podemos decir que la diferenciación hasta adipocitos se hace notable antes de la tinción, ya que la morfología muestra vacuolas refringentes a la luz, muy características (Figura 18B).



**Figura 18. Multipotencialidad de las rADSCs.** Imágenes tomadas tras la diferenciación de las rADSCs hasta osteoblastos, adipocitos y condroblastos. **A:** Diferenciación hasta osteoblastos y posterior tinción con NCIP/NBT. **B:** rADSCs diferenciadas hasta adipocitos, sin teñir. **C:** Condrocitos tras corte histológico en imagen de campo claro. **D:** Adipocitos tras tinción con Red Oil O. **E:** Inmunofluorescencia de Anti-Agrecan con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 para detección de condrocitos. Las imágenes han sido tomadas con el objetivo de 10x. Las barras blancas en el margen inferior izquierdo miden 100  $\mu\text{m}$ .

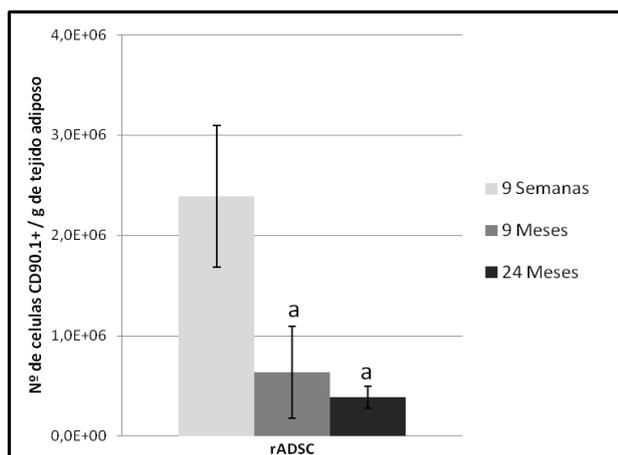
Con estos resultados de adherencia, fenotipado y diferenciación, podemos concluir que el método aplicado de obtención de rADSCs, a partir de tejido adiposo y tras separación inmunomagnética con el anticuerpo CD90.1-Microbeads, consigue unas rADSCs con capacidad multipotente y con un fenotipado muy semejante a lo que establece la ISCT. No se pudieron confirmar otros antígenos de superficie debido a la falta de consenso y, también, porque los resultados obtenidos son suficientemente evidentes para que sean consideradas células madre mesenquimales (MSCs).

## IV.3 ESTUDIOS COMPARATIVOS CELULARES Y TISULARES EN DISTINTAS EDADES DE HUMANOS Y RATAS

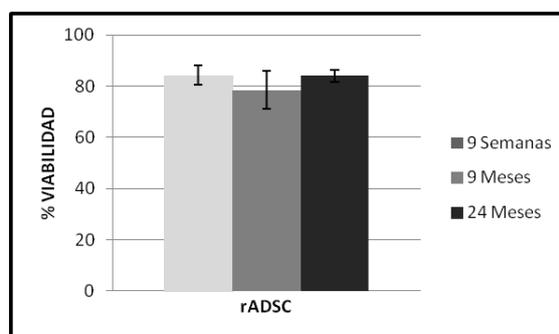
### IV.3.1 Ratios de aislamiento en ratas

Se sabe que el número de células madre disminuye con la edad, y también, su capacidad proliferativa y diferenciadora en diversas especies (Fehrer and Lepperdinger, 2005; Fehrer *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011). La mayoría de los métodos por los que se obtienen las ADSCs se realizan mediante cultivo de la SVF. Sin embargo, con este método no se puede establecer una correlación entre el número de ADSCs aisladas por gramo de tejido obtenido. Son pocos los autores que utilizan un sistema de purificación previo mediante tecnología MACS<sup>®</sup>, con el cual determinar el número de rADSCs extraídas por gramo de tejido y disponer de un método que nos sirva para cuantificar las variaciones en el número de células aisladas según el tratamiento, como se verá más adelante.

Como cabía esperar, son las rADSCs de la muestra de 9 semanas las que presentan mayor número de células aisladas por gramo de tejido adiposo ( $2,39 \times 10^6 \pm 7,06 \times 10^5$ ) (Figura 19), siendo estadísticamente diferente de los otros 2 grupos, cuya cantidades de células son  $6,35 \times 10^5 \pm 4,55 \times 10^5$ , para el grupo de animales adultos (9 meses), y de  $3,88 \times 10^5 \pm 1,11 \times 10^5$  para los animales envejecidos (24 meses). Esto demuestra que los animales jóvenes contienen un mayor número de células madre, produciéndose un descenso durante la edad adulta, que es aún menor en ratas de 24 meses, aunque no existe diferencia significativa entre estos últimos.



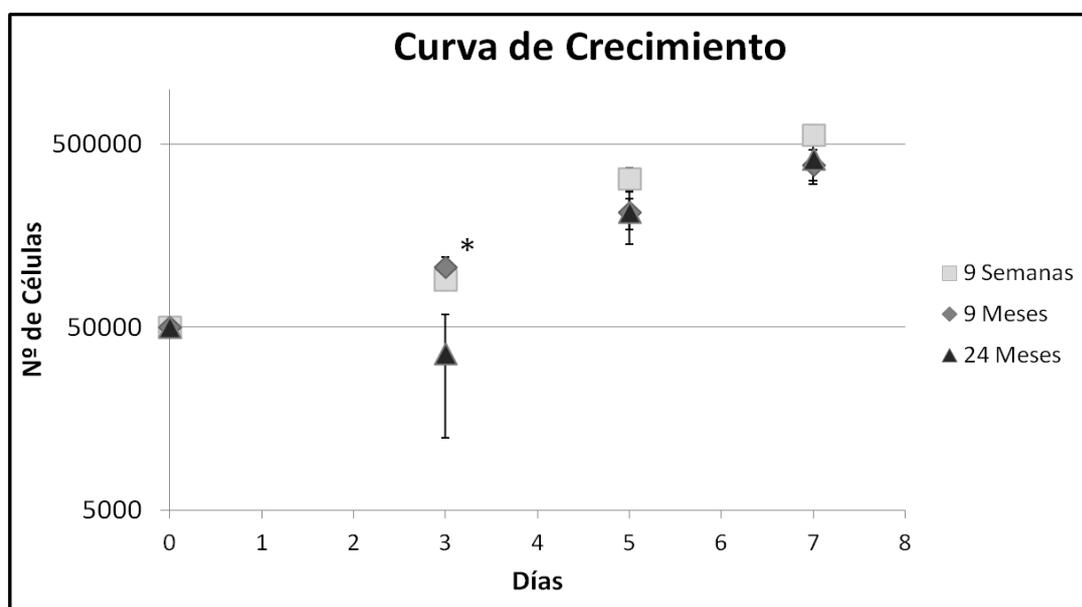
**Figura.19. Número de rADSCs por gramo de tejido adiposo.** Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cada grupo experimental (N=4). <sup>a</sup>Significativo (p=0,001) respecto al grupo “9 semanas”.



**Figura 20. Viabilidad de las rADSCs tras el aislamiento.** La viabilidad fue medida con Tripán Blue inmediatamente después de la separación magnética de las células. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cada grupo experimental (N=4). Estadísticamente no significativo (p>0,05).

También, podemos observar que el método de aislamiento no convierte a las rADSCs más vulnerables con la edad, pues no existe diferencia estadística entre la viabilidad de los diferentes grupos de edad (Figura 20).

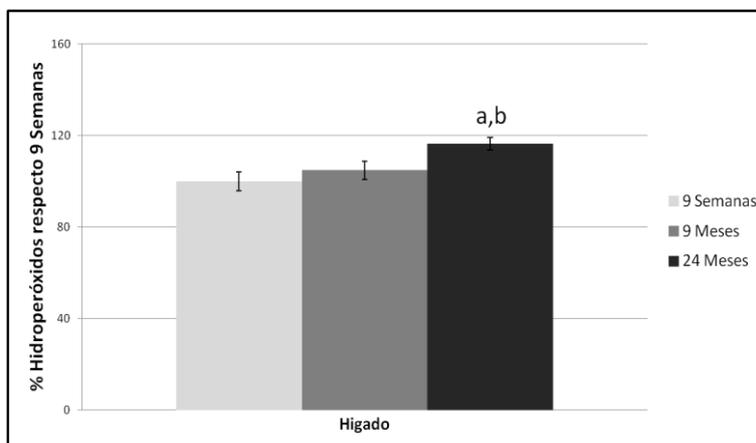
Si realizamos una curva de crecimiento de las células inmediatamente después del aislamiento, durante un período de 7 días, (período en el que aproximadamente alcanzan la confluencia), observamos que la velocidad de crecimiento no varía entre los grupos de edad (Figura 21). Se puede apreciar una diferencia al tercer día respecto al grupo de 24 meses. Esto sugiere que las células de ese grupo pueden tener una menor velocidad de crecimiento, o bien, mayor mortalidad tras la siembra, si bien en los sucesivos días existe una recuperación.



**Figura 21. Curva de Crecimiento de las rADSCs.** La gráfica representa el número de células totales de cada grupo experimental frente al número de días que estuvieron en cultivo. El análisis estadístico usado ha sido la prueba t de Student para comparar los grupos (N=4) para cada día de cultivo.\*p=0,003.

### IV.3.2 Peroxidación lipídica en extracto de hígado de rata

En este trabajo se han determinado los peróxidos lipídicos mediante el método FOX (Jiang *et al.*, 1991) en extractos de tejido hepático. Según los resultados obtenidos (Figura 22), los extractos hepáticos de los animales de 24 meses de edad son los que contienen más hidroperóxidos, un 16% más que el control (9 semanas), siendo estadísticamente significativo al resto de grupos (9 semanas y 9 meses). Sin embargo, a los 9 meses (edad adulta) no se había producido un incremento significativo (4,8%) de peroxidación respecto a 9 semanas.



**Figura 22. Hidroperóxidos lipídicos en extractos hepáticos de rata.** Los resultados representan el porcentaje de nmoles de hidroperóxidos / g de proteínas de cada muestra, considerando la muestra de 9 semanas como 100%. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (N=4). <sup>a</sup>Significativo ( $p=0,004$ ) respecto al grupo “9 semanas”. <sup>b</sup>Significativo ( $p=0,004$ ) respecto al grupo de “9 meses”.

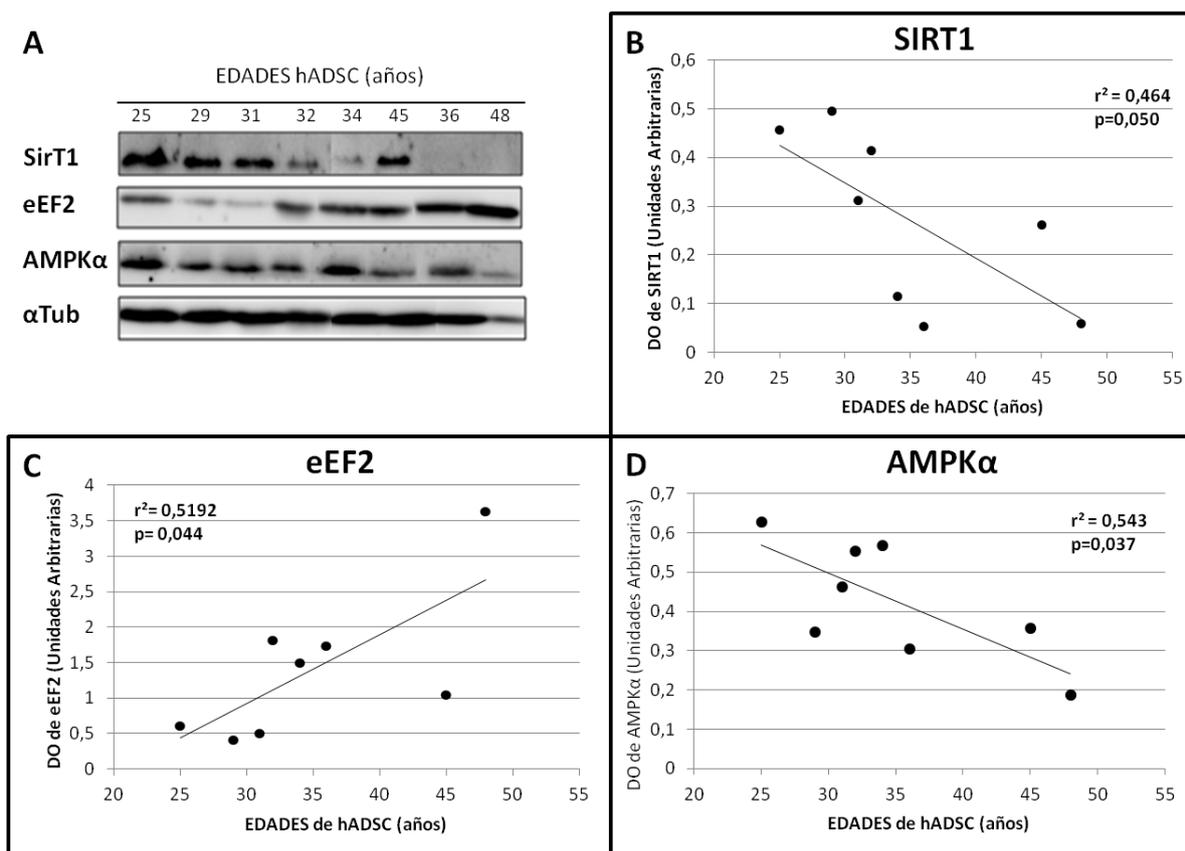
### IV.3.3 Variaciones de los niveles de proteínas implicadas en rutas bioquímicas de longevidad

#### IV.3.3.1 Células hADSCs

Son numerosos los estudios que existen en células madre sobre las rutas implicadas en procesos bioquímicos importantes como la diferenciación celular (Lee *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014a; Han *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2014), la respuesta a la restricción calórica (Mazzoccoli *et al.*, 2014; López-Lluch and Navas, 2015; Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2015), en el estrés oxidativo (Herrero *et al.*, 2008; Atashi *et al.*, 2015; Ido *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2015) y en los factores que pueden promover el envejecimiento (López-Lluch *et al.*, 2008; Brandl *et al.*, 2011; Burova *et al.*, 2013; Borodkina *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015; Gonzalez-Freire *et al.*, 2015) y otros. Pero son escasos los que abordan la homeostasis de la síntesis proteica como indicador de un buen estado de salud de las células madre.

Aunque las hADSCs hayan superado los criterios mínimos de la ISCT para ser consideradas células madre mesenquimales, pensamos que si el objetivo final de esas células

es su uso clínico, su “robustez” bioquímica en cuanto a la síntesis proteica tendrá que ser óptimo para que contribuyan en la reparación de tejidos dañados. Además, para entender mejor cualquier comportamiento que puedan tener las hADSCs frente al estrés oxidativo, la diferenciación celular o su potencialidad, es importante conocer previamente el estado de algunas proteínas intracelulares implicadas directa o indirectamente en la traducción.



**Figura 23. Resultados del análisis mediante WB de las proteínas SIRT1, eEF2 y AMPKα.** A: Imágenes tomadas de las bandas que aparecen para las distintas proteínas a identificar: SIRT1 (120 KDa), eEF2 (95 KDa), AMPKα (62KDa), y αTub (52KDa), como control de carga. Cada carril se corresponde con la edad de la que procedían las muestras de hADSCs. B: Gráfica de dispersión de puntos, donde cada punto es la densidad óptica obtenida de la intensidad de la banda de SIRT1 de cada edad dividida entre la intensidad de banda obtenida de su αTub. C y D: Se ha seguido el mismo criterio, pero analizando eEF2 y AMPKα respectivamente. (N=8).

Una de las proteínas que hemos estudiado en las hADSCs es SIRT1, debido a su implicación en numerosas rutas bioquímicas por su capacidad anti-envejecimiento, anti-oxidativa, anti-mitótica y de regulación metabólica (Auley *et al.*, 2015; Ido *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos muestran que SIRT1 disminuye con la edad en las hADSCs (Figura 23B).

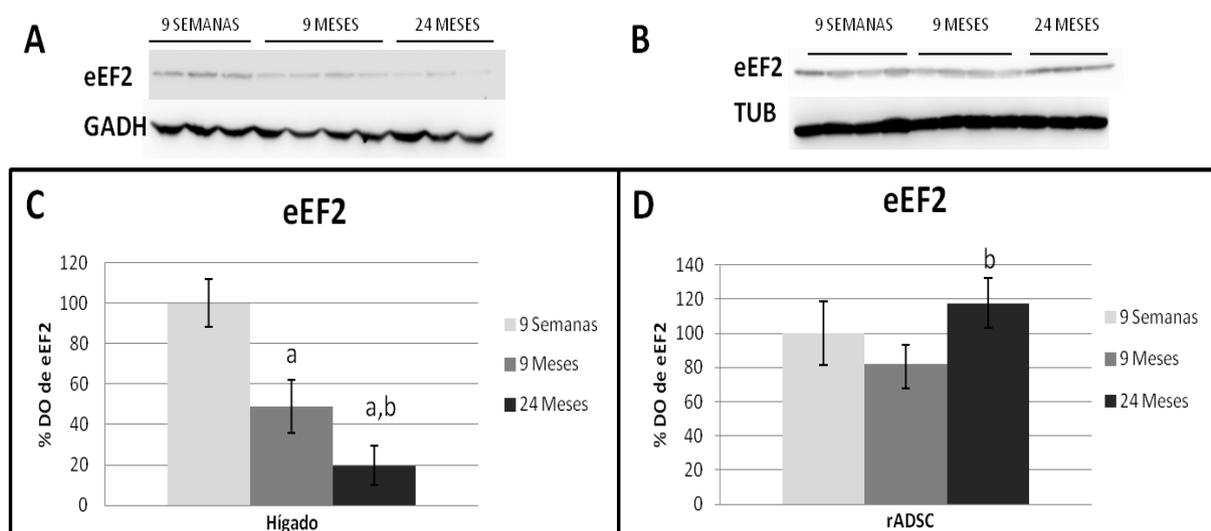
Otra proteína de interés es eEF2, implicada en la síntesis de proteínas, sensible al estrés oxidativo y sujeta a regulación por diferentes vías, tales como PI3K, mTOR y MAPKs

(Parrado *et al.*, 1999; Proud, 2007; Leprivier *et al.*, 2013; Argüelles *et al.*, 2014). Los resultados muestran que eEF2 aumenta en las hADSCs con la edad (Figura 23C).

Por otro lado, la proteína AMPK $\alpha$ , implicada en la biogénesis de mitocondrias y metabolismo energético (Long and Zierath, 2006; Niemann *et al.*, 2013; Leprivier *et al.*, 2014; Ido *et al.*, 2015; López-Lluch and Navas, 2015), disminuye en las hADSCs con la edad (Figura 23D).

#### IV.3.3.2 Células rADSCs y de tejido hepático de rata

En extractos hepáticos (Figuras 24A y 24C) se observa que los niveles de eEF2 disminuyen con la edad (Figura 24C). El grupo de 24 meses tiene un valor de eEF2 un 80% menor que el grupo de 9 semanas y un 30% menor que el grupo de 9 meses.

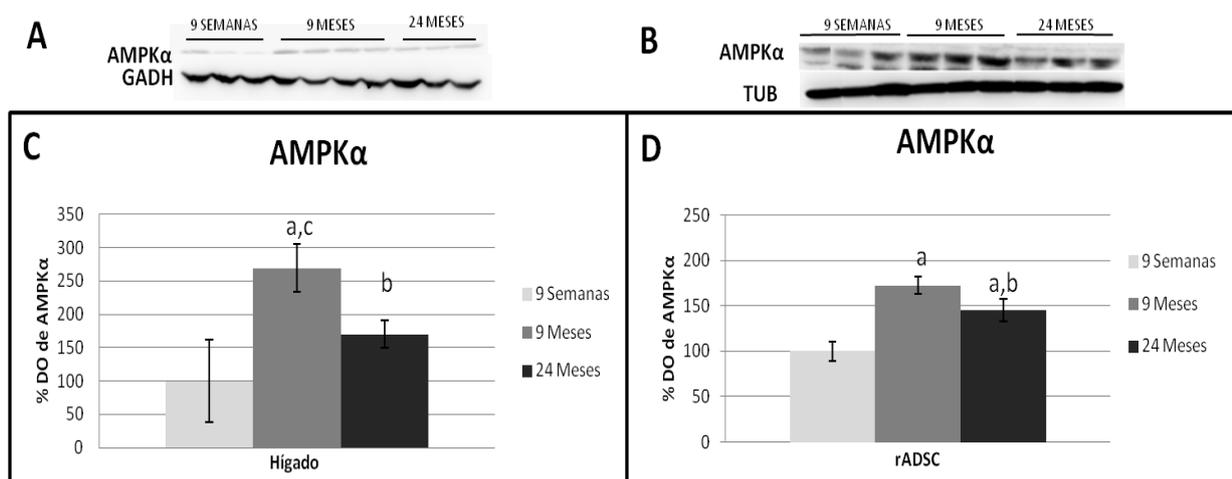


**Figura 24. Resultados del análisis mediante WB de eEF2 en hígado de rata y en rADSCs.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas eEF2 (95 KDa), y GADH (37KDa), como control de carga, en extractos de hígados de rata de diferentes edades (N=3, para los grupos de 9 semanas y 24 meses; y N=4, para el grupo de 9 meses). **C:** Diagrama de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar y donde se establece como 100% el valor de la muestra de “9 semanas”. En **B** y **D** se procede de la misma manera, pero las muestras son procedentes de las células rADSCs, y la proteína de control de carga es  $\alpha$ Tub (52KDa) (N=4, para los grupos de 9 semanas y 9 meses; y N=3, para el grupo de 24 meses). **C:** <sup>a</sup>Significativo ( $p < 0,001$ ) respecto al grupo “9 semanas”. <sup>b</sup>Significativo ( $p < 0,001$ ) respecto al grupo de “9 meses”. **D:** <sup>b</sup>Significativo ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo de “9 meses”.

En cambio, los resultados obtenidos en rADSCs muestran que el grupo de 24 meses es el que presenta un valor mayor de eEF2,  $117,62 \pm 14,62$  %, un 35% más que el grupo de 9 meses, siendo significativo ( $p < 0,05$ ), pero no así respecto al grupo de 9 semanas. Esta tendencia de aumento de eEF2 con la edad también se observó en las hADSCs.

En el caso de AMPK $\alpha$ , las variaciones con la edad ocurren de igual modo en hígado y en rADSCs (Figura 25). Según estos resultados, parece que en animales jóvenes la cantidad

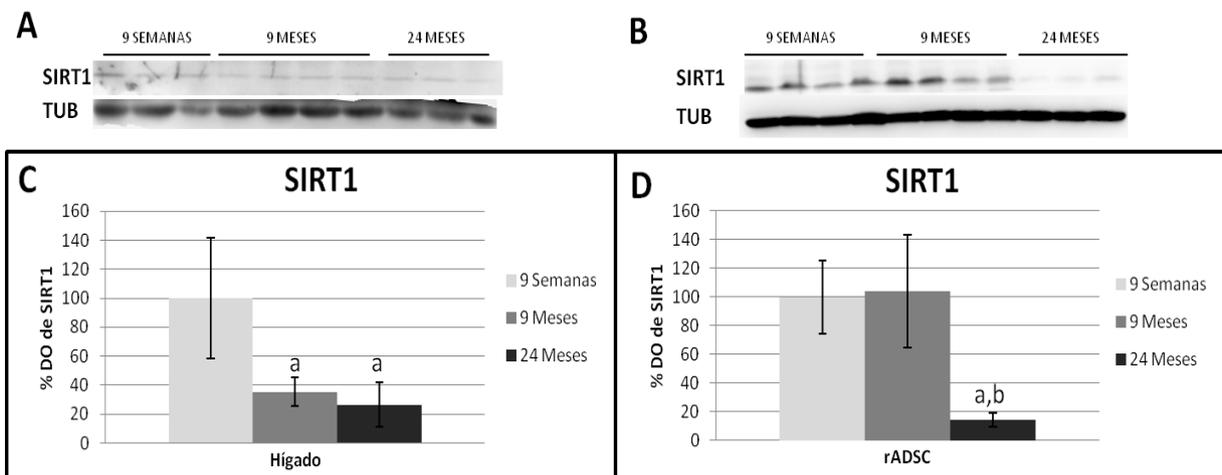
de AMPK $\alpha$  se encuentra disminuida, con respecto al grupo de 9 y 24 meses. Este hecho ocurre tanto en las muestras de tejido hepático (Figura 25A) como en las rADSCs (Figura 25B). Esto puede atribuirse a que los animales jóvenes presentan un balance positivo de Nitrógeno, con formación de nuevos tejidos, de ahí que eEF2 esté elevado y AMPK $\alpha$  disminuido (la energía se emplea en la proliferación tisular).



**Figura 25. Resultados del análisis mediante WB de AMPK $\alpha$  en hígado de rata y en rADSCs.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas AMPK $\alpha$  (62 KDa) y GADH (37KDa), como control de carga, en extractos de hígados de las muestras en diferentes edades (N=3, para los grupos de 9 semanas y 24 meses; y N=4, para el grupo de 9 meses). **C:** Diagrama de barras, donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar y donde se establece como 100% el valor de la muestra de “9 semanas”. **B y D:** Se lleva a cabo de la misma manera pero las muestras son procedentes de las células rADSCs, y la proteína de control de carga es  $\alpha$ Tub (52KDa) (N=,3 para todos los grupos). **C:** <sup>a</sup>Significativo (p<0,01) respecto al grupo “9 semanas”. <sup>b</sup>Significativo (p<0,01) respecto al grupo “9 meses”. <sup>c</sup>Significativo (p<0,01) respecto al grupo “24 meses”. **D:** <sup>a</sup>Significativo (p<0,001) respecto al grupo “9 semanas”. <sup>b</sup>Significativo (p<0,001) respecto al grupo “9 meses”.

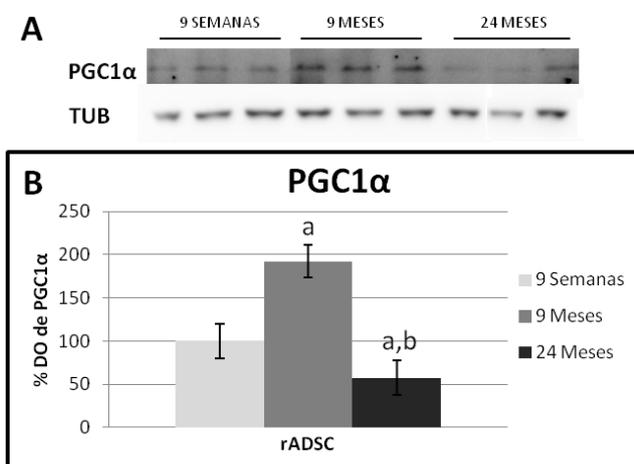
Si analizamos lo que ocurre entre la edad adulta y 24 meses vemos que los animales de 9 meses tienen valores más altos de AMPK $\alpha$ , un 99 % más, que los animales de 24 meses en hígado (Figura 25C). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre el grupo de 9 semanas y el de 24 meses. En cuanto a la cantidad de AMPK $\alpha$  en las rADSCs, los animales de 9 meses tienen un 27% más que los de 24 meses (Figura 25D).

En cuanto a los resultados obtenidos con SIRT1 se observa que disminuye en el tejido hepático con la edad, entre un 65-75% con respecto a 9 semanas (Figura 26C). En las rADSCs, la disminución sólo ocurrió a los 24 meses, siendo los niveles un 85% más bajo que el grupo de 9 semanas (Figura. 26D).



**Figura 26. Resultados del análisis mediante WB de SIRT1 en hígado de rata y en rADSCs.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas SIRT1 (120 KDa) y  $\alpha$ Tub (52 KDa), como control de carga, de las muestras en diferentes edades (N=3, para los grupos de 9 semanas y 24 meses; y N=4, para el grupo de 9 meses). **C:** Diagrama de barras, donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar, donde se establece como 100% el valor de la muestra de “9 semanas”. **B y D:** Se lleva a cabo de la misma manera, pero las muestras proceden de las células (N=4, para los grupos de 9 semanas y 9 meses; y N=3, para el grupo de 24 meses). **C:** <sup>a</sup>Significativo ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo “9 semanas”. **D:** <sup>a</sup>Significativo ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo “9 semanas”. <sup>b</sup>Significativo ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo “9 meses”.

También, se analizaron los niveles de la proteína PGC1 $\alpha$ , la cual puede inducir la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos cuando se necesita energía para la síntesis proteica, mediante la activación de la ruta mTOR (Laplante and Sabatini, 2012). Además, puede inducir la transcripción de genes gluconeogénicos por acción de SIRT1 (Rodgers *et al.*, 2005; Lopez-Lluch *et al.*, 2008; Lopez-Lluch and Navas, 2015), y puede promover la biogénesis mitocondrial, por activación de AMPK $\alpha$  (Jäger *et al.*, 2007) y otras organelas (Bagattin *et al.*, 2010) e interviene en la protección frente al estrés oxidativo (Wenz *et al.*, 2009; Austin and St-Pierre, 2012). Los resultados obtenidos (Figura 27), muestran que los niveles de PGC1 $\alpha$  aumentan a los 9 meses y decaen en los animales de 24 meses.

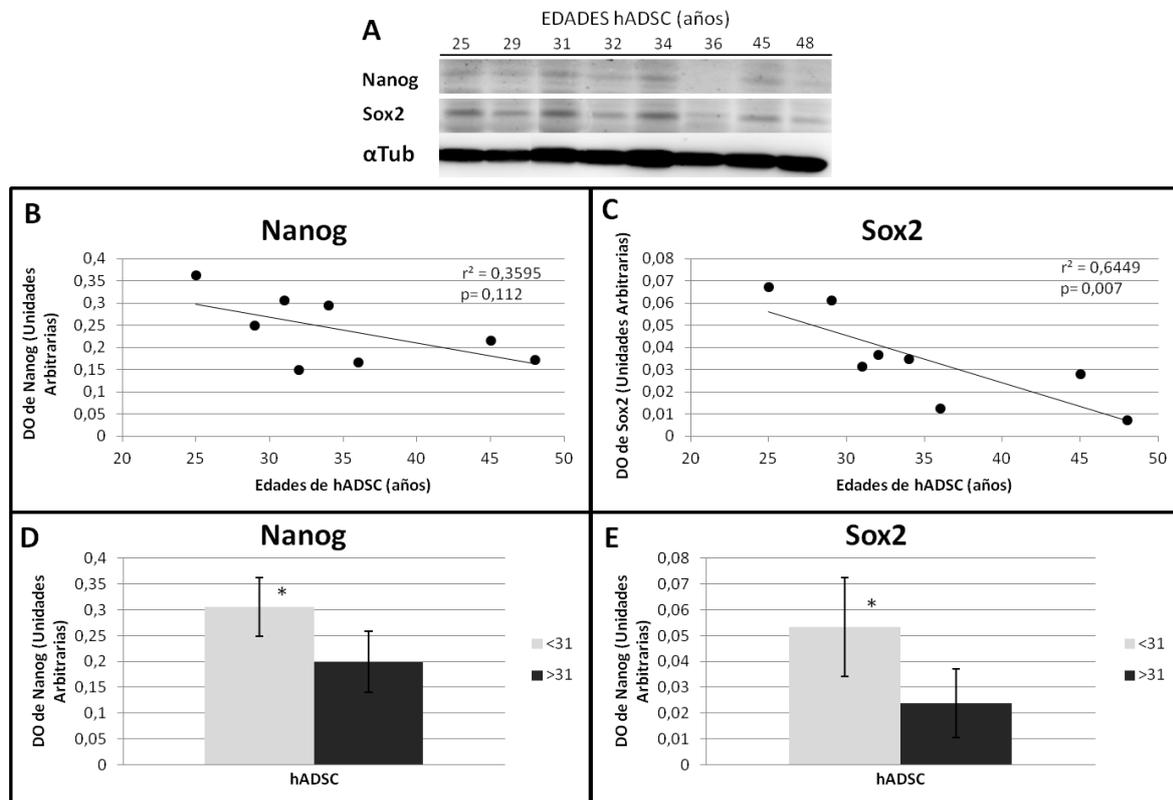


**Figura 27. Resultados del análisis mediante WB de PGC1 $\alpha$  en rADSCs.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas PGC1 $\alpha$  (120 KDa) y  $\alpha$ Tub (52 KDa), como control de carga, de las muestras en diferentes edades (N=3). **B:** Diagrama de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar, donde se establece como 100% el valor de la muestra de “9 semanas”. <sup>a</sup>Significativo ( $p < 0,001$ ) respecto al grupo “9 semanas”, <sup>b</sup>Significativo ( $p < 0,001$ ) respecto al grupo de “9 meses”.

### IV.3.4 Evaluación de la potencialidad de las células madre mediante la determinación de los niveles de las proteínas Nanog y Sox2

#### IV.3.4.1 Células hADSCs

Desde que se descubrieron los cuatro factores de transcripción Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc (tres factores de potencialidad y uno de proliferación, respectivamente), con los cuales se podía reprogramar células somáticas y transformarlas en células madre embrionarias (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Yamanaka, 2008), se han venido utilizando otros factores, para determinar el grado de potencialidad de las células madre. En nuestro caso, nos hemos centrado en evaluar la potencialidad de las hADSCs mediante la cuantificación de los niveles de las proteínas Nanog y Sox2. Nanog se ha usado como



**Figura 28. Resultados del análisis mediante WB de las proteínas indicadoras de pluripotencialidad Nanog y Sox2.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas que aparecen de las distintas proteínas a identificar: Nanog (28-36 KDa), Sox2 (35 KDa) y  $\alpha$ Tub (52KDa) como control de carga. Cada carril se corresponde con la edad de la que procedían las muestras de hADSCs. **B y C:** Gráfica de dispersión de puntos, donde cada valor es la densidad óptica obtenida de la intensidad de la banda de Nanog y Sox2, respectivamente para cada edad dividida entre la intensidad de banda obtenida de su  $\alpha$ Tub correspondiente. El análisis estadístico mediante el test de Pearson para muestras con correlaciones paramétricas (N=8) ofreció un valor estadístico de  $p=0,112$  para el diagrama B (Nanog) y un valor estadístico de  $p=0,007$  para el diagrama C (Sox2). **D y F:** Diagrama de barras en el que las muestras se han dividido en dos grupos, uno menor de 31 años (<31) (N=3) y otro mayor de 31 años (>31) (N=5). \*Significativo ( $p<0,05$ ).

indicador de potencialidad por otros autores (Siegel *et al.*, 2013; Carelli *et al.*, 2014) y Sox2 se encuentra muy relacionado con la auto-renovación de las MSCs y su diferenciación hasta osteoblastos y adipocitos (Seo *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2014). Evaluar el estado de potencialidad de las hADSCs es importante sobre todo si se va a realizar terapia celular, pues si previamente se comprueba que los niveles son altos, existirían más posibilidades de éxito terapéutico y mayor grado de diferenciación.

Los resultados obtenidos muestran que tanto Nanog como Sox2 tienden a disminuir en las hADSCs con la edad (Figuras 28B y 28C). Esto sugiere que con el envejecimiento disminuyen las capacidades de auto-renovación de las hADSCs.

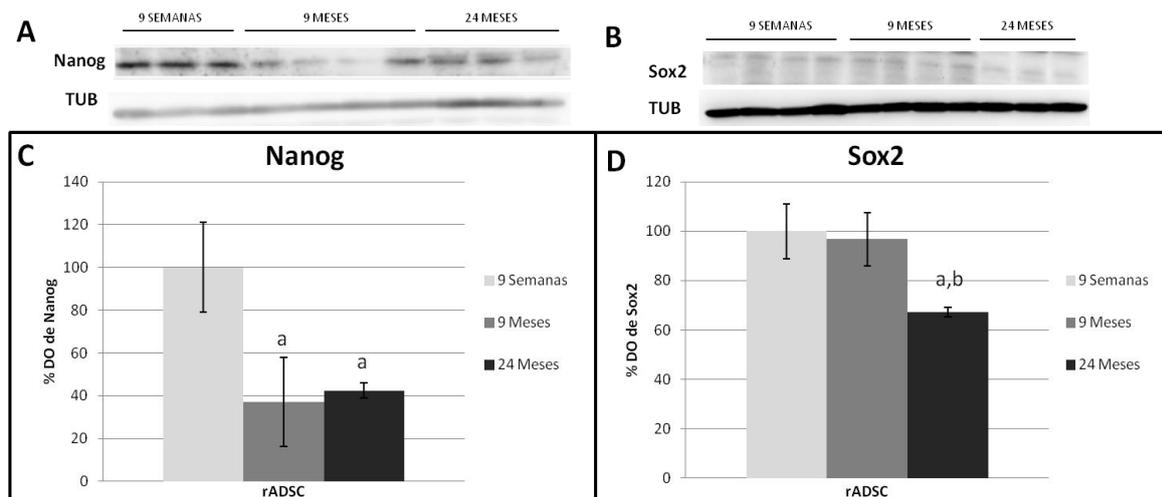
Si se agrupan los resultados en menores (N=3) y mayores de 31 años (N=5)<sup>7</sup>, se observa para Nanog una disminución del 35% en las hADSCs mayores de 31 años (Figura 28D). En cuanto a Sox2 (Figura 28E), la diferencia entre los grupos es también significativa ( $p=0,040$ ), produciéndose una disminución del 54% en las hADSCs mayores de 31 años.

#### IV.3.4.2 Células rADSCs

En rADSC, los resultados muestran que Nanog disminuye con la edad drásticamente (Figuras 29A y 29C). En el caso de Sox2 es el grupo de 24 meses (Figuras 29C y 29D) el que presenta los valores más bajos. Esto sugiere que tienen más potencialidad las células más jóvenes, perdiéndose esa potencialidad con el paso del tiempo. Sin embargo, se observa que en las rADSC adultas aún se expresan factores de potencialidad, aunque casi exclusivamente Sox2, ya que Nanog presenta valores muy inferiores. Las muestras más envejecidas son las que menos potencialidad presentan, pero aun así su valor no es nulo.

---

<sup>7</sup> Esta distribución no homogénea de N se ha establecido para mantener el mismo criterio que en los experimentos de diferenciación hasta osteoblastos y adipocitos (apartado III.5.1 y III.6.1 de Resultados) en el que  $N_{total}$  es 7 y se distribuyen en dos grupos uno de N=4 con edades menores de 30 y otro grupo con N=4 con edades mayores de 30. En este experimento no podemos establecer un grupo menor de 30, porque el N sería igual a 2, de ahí que estemos estableciendo el límite en 31 años.



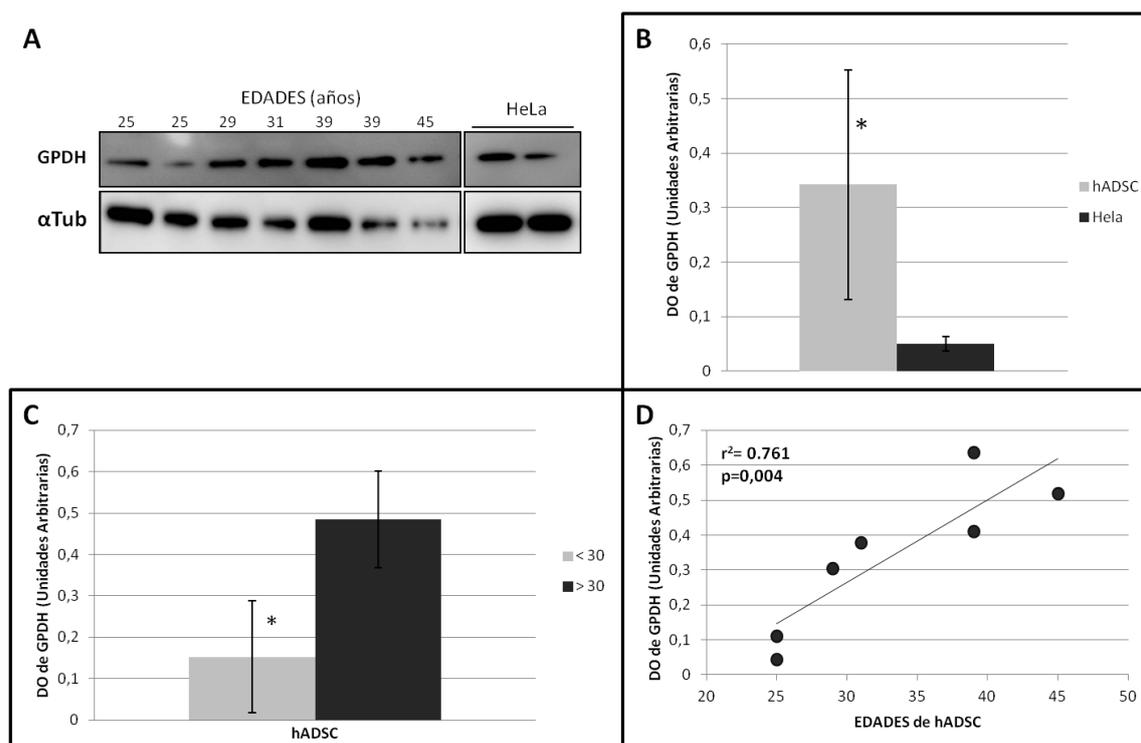
**Figura 29. Resultados del análisis mediante WB de las proteínas indicadoras de pluripotencialidad Nanog y Sox2.**  
**A y B:** Imágenes de las bandas que aparecen de las muestras a distintas edades de Nanog (28-36 KDa) y Sox2 (35KDa), respectivamente, además de  $\alpha$ Tub (52KDa), como control de carga, (N=3, para los grupos de 9 semanas y 24 meses; y N=4, para el grupo de 9 meses). **C y D:** Diagramas de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar donde se establece como 100% el valor de la muestra de “9 semanas (N=4, para los grupos de 9 semanas y 9 meses; y N=3, para el grupo de 24 meses). **C:** <sup>a</sup>Significativo ( $p<0,01$ ) respecto al grupo “9 semanas”. **B:** <sup>a</sup>Significativo ( $p<0,01$ ) respecto al grupo “9 semanas”. <sup>b</sup>Significativo ( $p<0,01$ ) respecto al grupo “9 meses”.

### IV.3.5 Cuantificación de la diferenciación hasta adipocitos de las células ADSCs de distintas edades

#### IV.3.5.1 Células hADSCs

Al igual que ocurre con la diferenciación hasta osteoblastos, no existe un consenso para establecer un método que cuantifique la diferenciación hasta adipocitos y la ISCT tampoco contempla esa posibilidad (Dominici *et al.*, 2006). En la literatura científica existen diversos métodos de cuantificación y la mayoría de ellos están relacionados con la medida de los niveles de algún factor relacionado con la diferenciación, y en este caso el más usado es PPAR $\gamma$  (Seo *et al.*, 2013). Uno de los primeros métodos usados fue medir la actividad enzimática y cantidad de la enzima glycerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) (Adams *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 2008; Ortiz-Colón *et al.*, 2009). Otros métodos consisten en realizar un conteo de los adipocitos (Zhu *et al.*, 2009) y también realizar ensayos colorimétricos tras la tinción de las vacuolas con el reactivo Oil Red O (Purohit *et al.*, 2013). En nuestro caso se midieron los niveles de GPDH mediante WB.

Al igual que hicimos anteriormente para demostrar que existe más cantidad de GPDH en las hADSCs diferenciadas hasta adipocitos que en cualquier otra célula, sometimos al mismo tratamiento de diferenciación células HeLa y observamos que las hADSCs diferenciadas hasta adipocitos presentan un 85% más de GPDH (Figura 30B), siendo esta diferencia significativamente diferente ( $p=0,024$ ). Seguidamente, pasamos a ver si existen diferencias en los niveles de GPDH entre las hADSCs de distintas edades, agrupándolas en



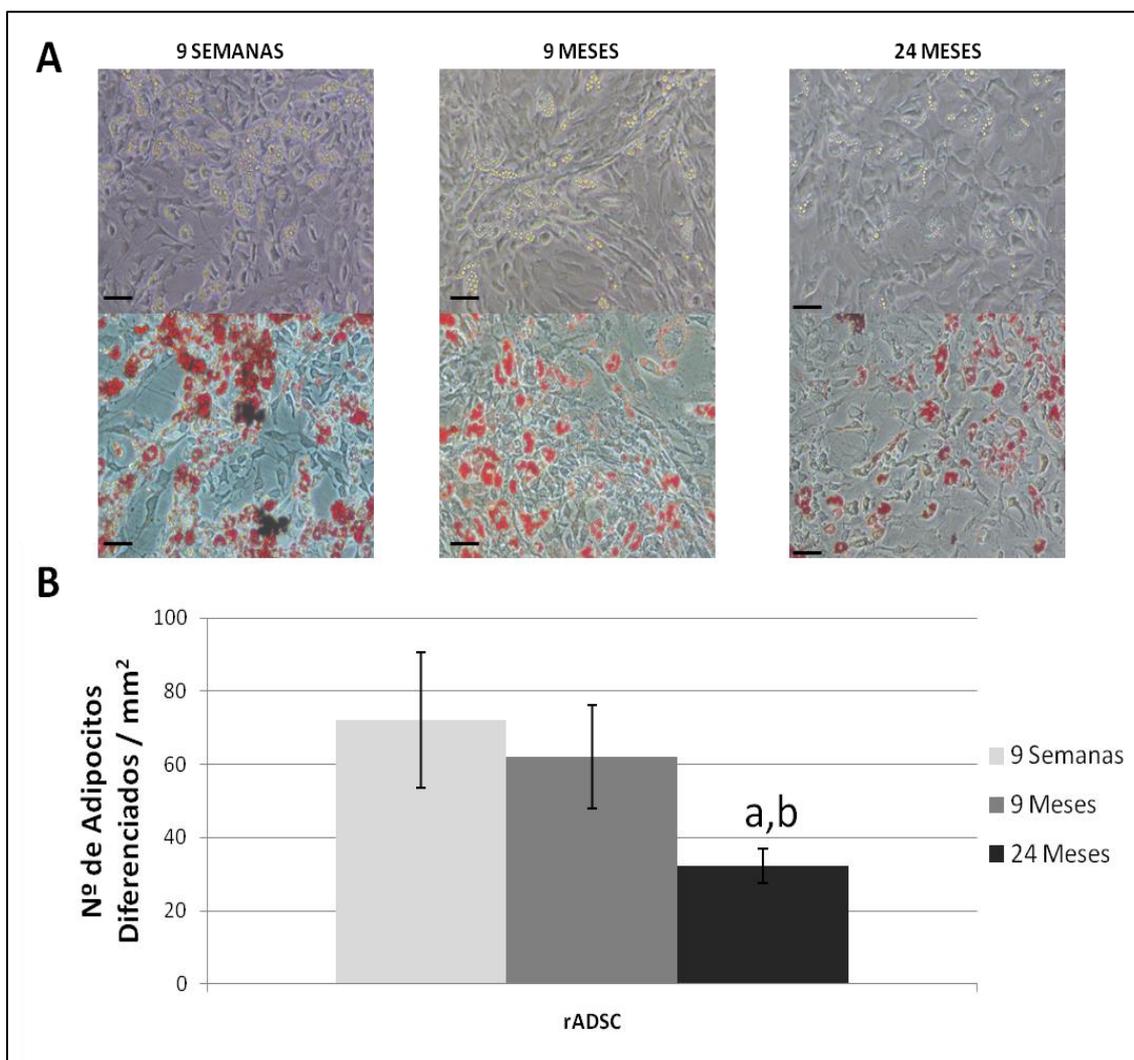
**Figura 30. Niveles de GPDH tras la diferenciación de las hADSCs hasta adipocitos. A:** Imágenes tomadas de las bandas que aparecen de GPDH (~38 KDa) y  $\alpha$ Tub (52KDa), como control de carga. Cada carril corresponde con la edad de la que procedían las muestras de hADSCs y las obtenidas de la línea celular HeLa. **B y C** Histograma de barras donde el valor es la densidad óptica obtenida de la intensidad de la banda de GPDH de cada grupo experimental dividida entre la intensidad de banda obtenida de su  $\alpha$ Tub. **D:** Se muestra una gráfica de dispersión de puntos donde representamos los niveles de GPDH frente a las distintas edades de las muestras hADSCs (N=7). \*Significativo  $p<0,05$ .

menores y mayores de 30 años. Según los resultados obtenidos (Figura 30C), las hADSCs “<30” tienen un 68,5 % menos que las hADSCs “>30”. Por último, la Figura 30D muestra que, además, existe una correlación positiva significativa ( $r^2=0,761$ ) ( $p= 0,004$ ) entre los niveles de GPDH y la edad.

#### IV.3.5.2 Células rADSCs

Los medios de diferenciación que suministran las casas comerciales ocasionan una excesiva diferenciación hasta adipocitos. Ello provoca que el recuento celular se realice con dificultad debido a la alta población de vacuolas que imposibilita distinguir las diferentes

células. Por ese motivo, se llevó a cabo la estrategia de variar la concentración del medio de diferenciación mediante una dilución  $\frac{1}{4}$ . Al diluir los agentes que promueven la diferenciación también estamos evidenciando la sensibilidad que tienen las rADSCs ante un estímulo de diferenciación. A pesar de diluir el medio de diferenciación se consigue diferenciar las células en las tres edades (Figura 31A).



**Figura 31. Cuantificación de diferenciación hasta adipocitos de rADSCs.** A: Imágenes tomadas como representación de los grupos de diferentes edades. Las imágenes superiores son los adipocitos antes de teñir y las imágenes inferiores después de la tinción con Red Oil O. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo de 10x. La barra negra indica un diámetro de 100  $\mu\text{m}$ . B: Diagramas de barras que representan el nº de adipocitos/mm<sup>2</sup>  $\pm$  desviación estándar, frente a cada grupo de animales. <sup>a</sup>Significativo ( $p=0,007$ ;  $N=4$ ) respecto al grupo “9 semanas”. <sup>b</sup>Significativo ( $p=0,007$ ;  $N=4$ ) respecto al grupo “9 meses”.

Los resultados muestran que esta diferenciación disminuye con la edad pero no existen diferencias significativas entre los grupos de 9 semanas y 9 meses. Sí que existen diferencias significativas con el grupo de 24 meses, donde los adipocitos disminuyen un 44% con respecto a la muestra de 9 semanas (Figura 31B). Esto muestra que las células procedentes de los animales más jóvenes tienen mayor capacidad para diferenciarse hasta

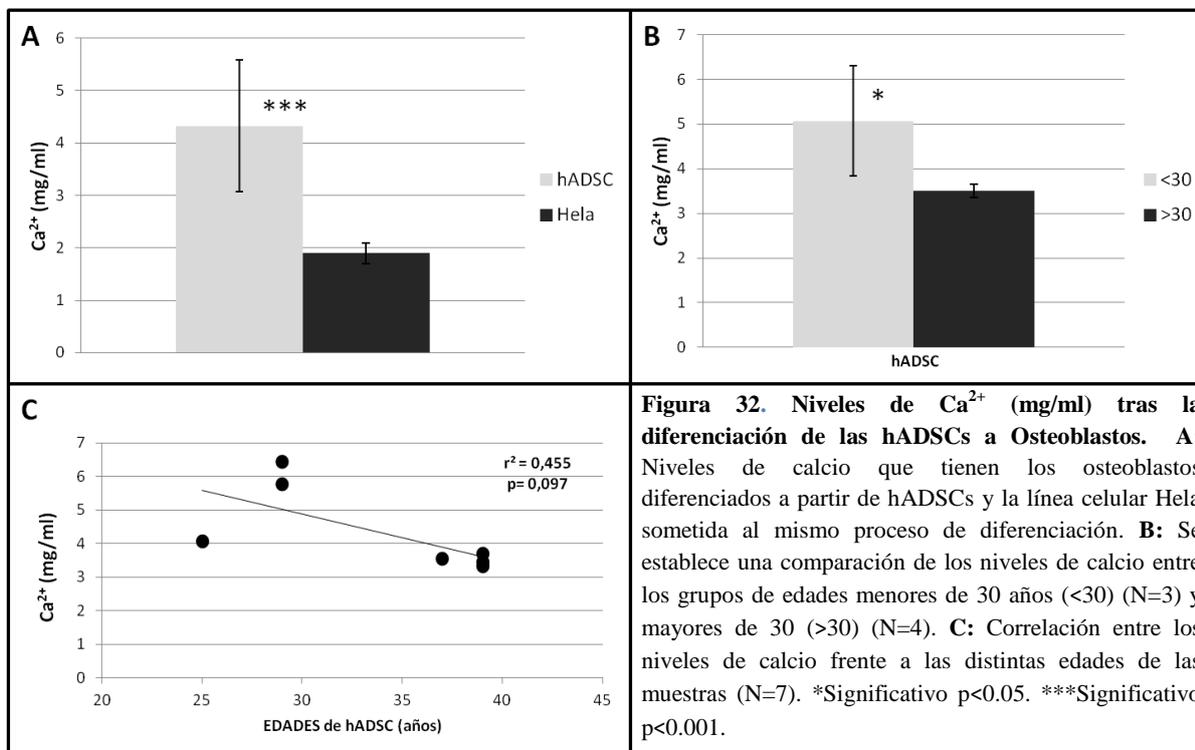
adipocitos que las más viejas. Otra observación a tener en cuenta es que el perfil de diferenciación presenta la misma tendencia que los niveles de Sox2, donde el grupo más joven y el de edad adulta no eran estadísticamente diferentes entre sí, pero si lo era el grupo 24 meses. Es una prueba más de la implicación de Sox2 en la diferenciación adipogénica y osteoblástica (Seo *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2013).

### IV.3.6 Cuantificación de la diferenciación hasta osteoblastos de las células ADSCs de distintas edades

#### IV.3.6.1 Células hADSCs

Para cuantificar la diferenciación hasta osteoblastos, hemos elegido el método de Raicevic *et al.*, (2010), que cuantifica los niveles de calcio tras la diferenciación osteoblástica.

Como control sometimos al mismo tratamiento de diferenciación a las células HeLa (Figura 32A). Seguidamente estudiamos las diferencias en los niveles de calcio de las hADSCs de distintas edades, agrupándolas en menores y mayores de 30 años. Según los resultados obtenidos, las hADSCs “<30” tienen mayores niveles de calcio (36%) que las hADSCs “>30” (Figura 32B). Sin embargo, no podemos establecer una correlación

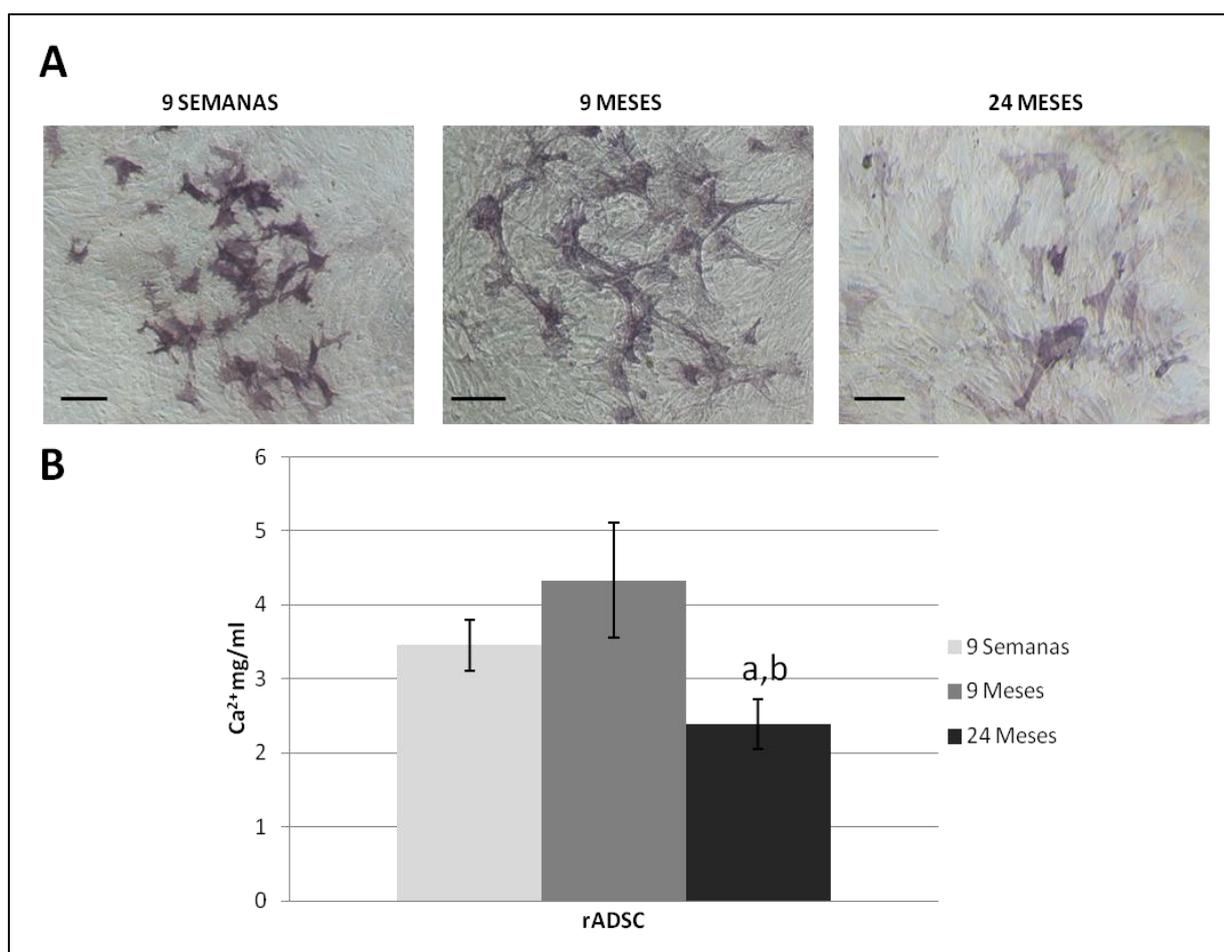


**Figura 32. Niveles de Ca<sup>2+</sup> (mg/ml) tras la diferenciación de las hADSCs a Osteoblastos. A:** Niveles de calcio que tienen los osteoblastos diferenciados a partir de hADSCs y la línea celular HeLa sometida al mismo proceso de diferenciación. **B:** Se establece una comparación de los niveles de calcio entre los grupos de edades menores de 30 años (<30) (N=3) y mayores de 30 (>30) (N=4). **C:** Correlación entre los niveles de calcio frente a las distintas edades de las muestras (N=7). \*Significativo p<0.05. \*\*\*Significativo p<0.001.

significativa ( $p > 0,05$ ) entre las cantidades de calcio y las edades de las hADSCs (Figura 32C), a pesar de que existe una correlación de Pearson negativa ( $r^2 < 0,5$ ).

#### IV.3.6.2 Células rADSCs

La diferenciación a osteoblastos se estudió en rADSC de distintas edades. Los resultados muestran que la diferenciación disminuye en el grupo de 24 meses donde la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es un 54, 96% menor con respecto al grupo de 9 meses. Esto también



**Figura 33. Cuantificación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  tras diferenciación hasta osteoblastos.** A: Imágenes tomadas, como representación de los grupos de diferentes edades, de los osteoblastos teñidos con BCIP/NBT. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo de 20x. La barra negra indica un diámetro de 50  $\mu\text{m}$ . B: Diagramas de barras que representan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (mg/ml)  $\pm$  desviación estándar, frente a cada grupo de animales. El análisis estadístico se ha realizado mediante ANOVA seguido del test de Tukey  $p=0,002$  ( $N=4$ ). <sup>a</sup>Significativo ( $p=0,002$ ;  $N=4$ ) respecto al grupo “9 semanas”, <sup>b</sup>Significativo ( $p=0,002$ ;  $N=4$ ) respecto al grupo “9 meses”.

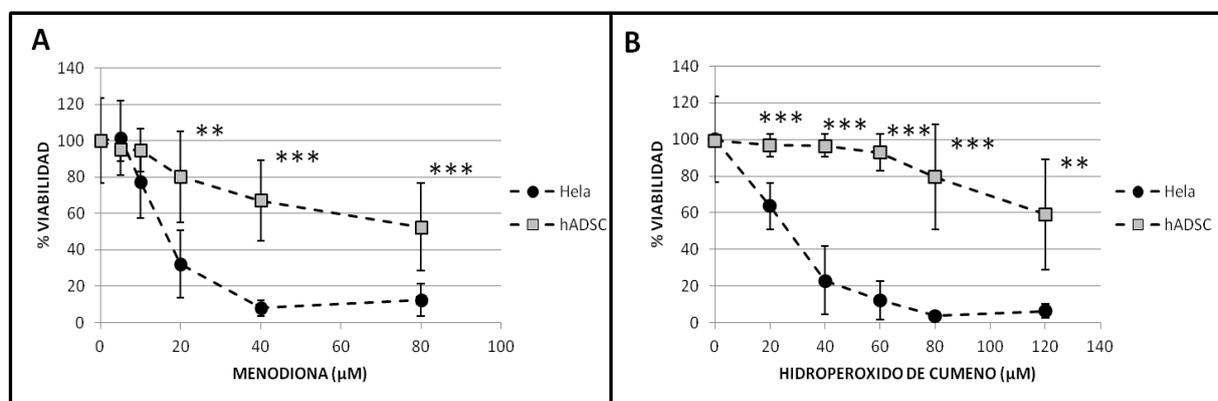
indica que las células procedentes de los animales más jóvenes tienen mayor capacidad para diferenciarse a osteoblastos que las más viejas. El perfil de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  también se asemeja a los niveles de Sox2, donde el grupo más joven y el de edad adulta no eran diferentes estadísticamente entre sí, pero sí lo era el de edad más avanzada.

## IV.4 RESISTENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSEO

### IV.4.1 Células hADSCs

#### IV.4.1.1 Viabilidad con hidroperóxido de cumeno (CH) y con menadiona (MD)

Si se realiza terapia celular con el objetivo de reparar, reemplazar y regenerar los tejidos dañados por procesos de inflamación, necrosis, degeneración, etc, hay que tener en cuenta que en dichos procesos se produce una gran liberación de radicales libres (Sorolla *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010b; Sorolla *et al.*, 2012; de Pablos *et al.*, 2014b; Hu *et al.*, 2014; Garcia-Olmo *et al.*, 2015), que probablemente van a estar presentes en el sitio de implantación de las células. Consideramos, por tanto, importante estudiar la resistencia de las hADSCs al estrés oxidativo, para intuir con qué efectividad podrán llevar a cabo sus funciones reparadoras en ese ambiente “hostil”. Los agentes oxidantes que hemos utilizado para evaluar esa resistencia son menadiona (MD), cuyo efecto está mediado por iones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Criddle *et al.*, 2006; Klotz *et al.*, 2014), e hidroperóxido de cumeno (CH), que tiene un efecto más pronunciado en la peroxidación lipídica y en la formación de aductos (Argüelles *et al.*, 2013; Ayala *et al.*, 2014).



**Figura 34. Curva de viabilidad de resistencia al estrés oxidativo.** Las gráficas representan la viabilidad en porcentajes, resultante del ensayo de MTS frente a la concentración del agente oxidante, para las muestras hADSCs y HeLa. Agente oxidante utilizado **A:**Menadiona. **B:** Hidroperóxido de Cumeno. \*\*Significativo (N=8,  $p < 0,01$ ). \*\*\*Significativo (N=8,  $p < 0,001$ ).

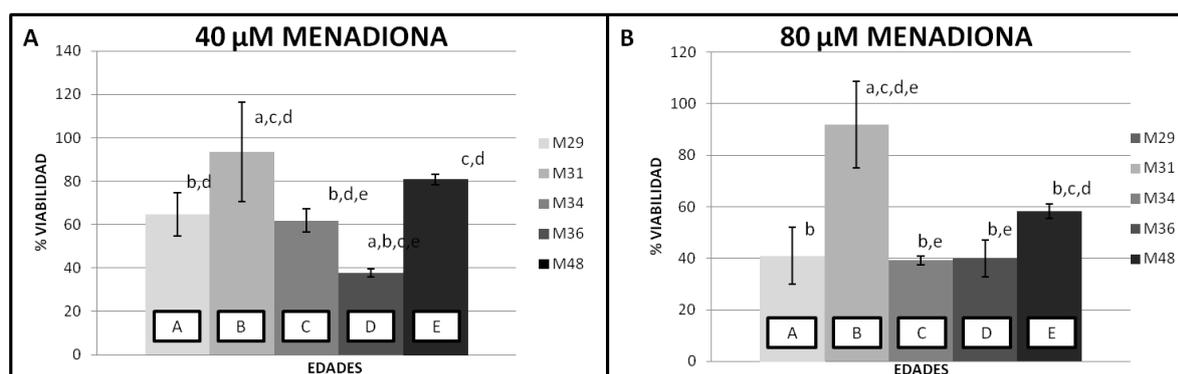
La posible sensibilidad AL estrés oxidativo de las hADSCs se ha comparado con la de las células HeLa. En ambos casos, se produce una disminución progresiva de la viabilidad conforme vamos aumentando la concentración del agente oxidante. Cuando se emplea MD, la disminución es rápida y progresiva para hADSC y HeLa (Figura 34A). En el caso del CH solo es rápida y progresiva para HeLa (Figura 34B). Para dosis bajas de MD (5-10  $\mu$ M) parece que

no existen diferencias de sensibilidad al estrés oxidativo entre hADSCs y HeLa. Sólo a dosis superiores a 20  $\mu\text{M}$  comienzan a aparecer diferencias estadísticamente significativas. Cuando se emplea CH como agente oxidante, se pueden observar diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de células a la dosis más baja utilizada (Figura 34B). Además a dosis de CH menores de 80  $\mu\text{M}$  la viabilidad de las hADSCs prácticamente no se afectan, en comparación con HeLa.

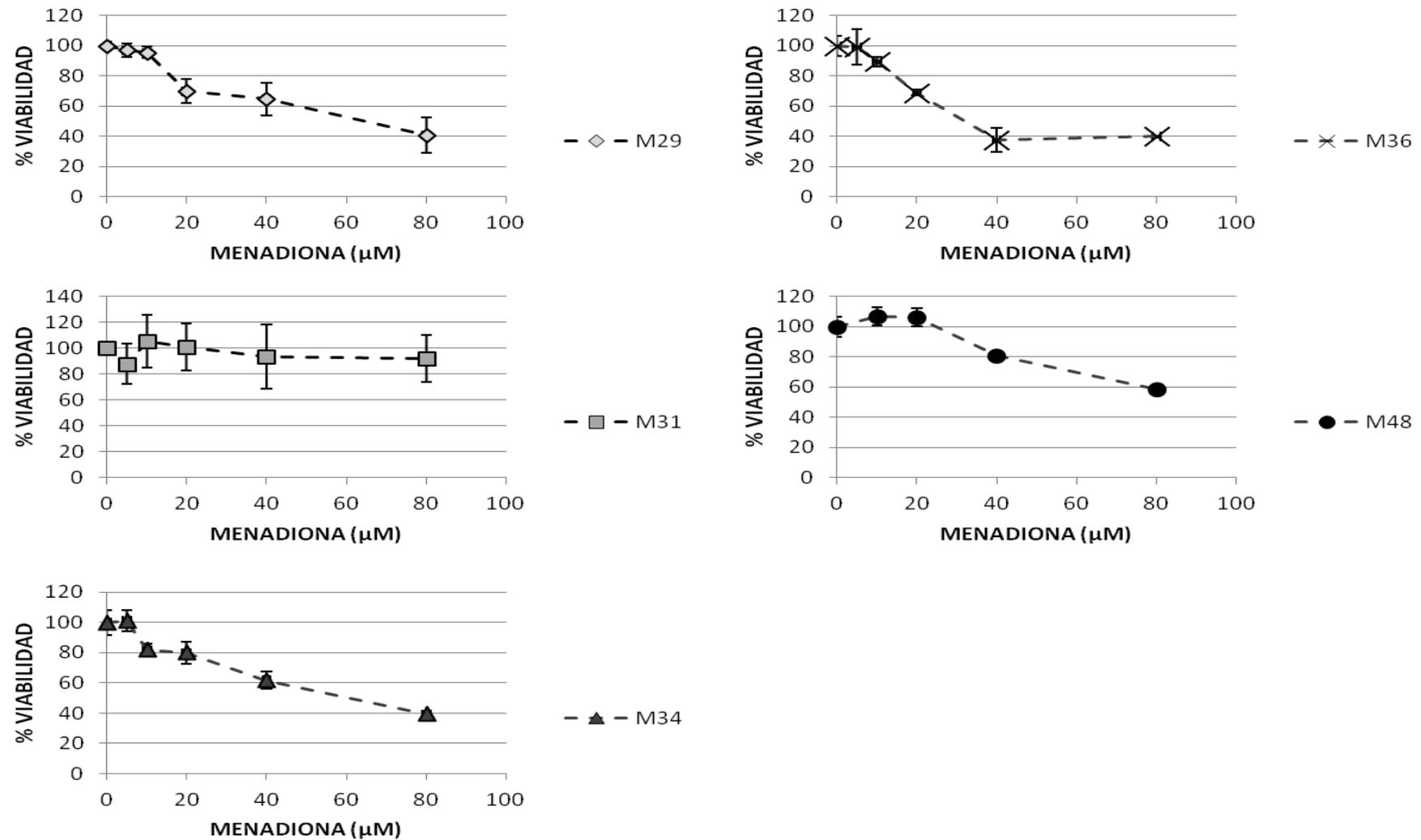
#### IV.4.1.2 Viabilidad con menadiona. Comparación con la edad

En la Figura 35 (véase siguiente página) podemos ver que la sensibilidad de las hADSCs al estrés oxidativo inducido por MD no es igual a todas las edades. Para una dosis 20  $\mu\text{M}$  de MD las edades más resistentes son las de 31 y 48 años. Las menos resistentes corresponden a las edades de 29 y 36 años.

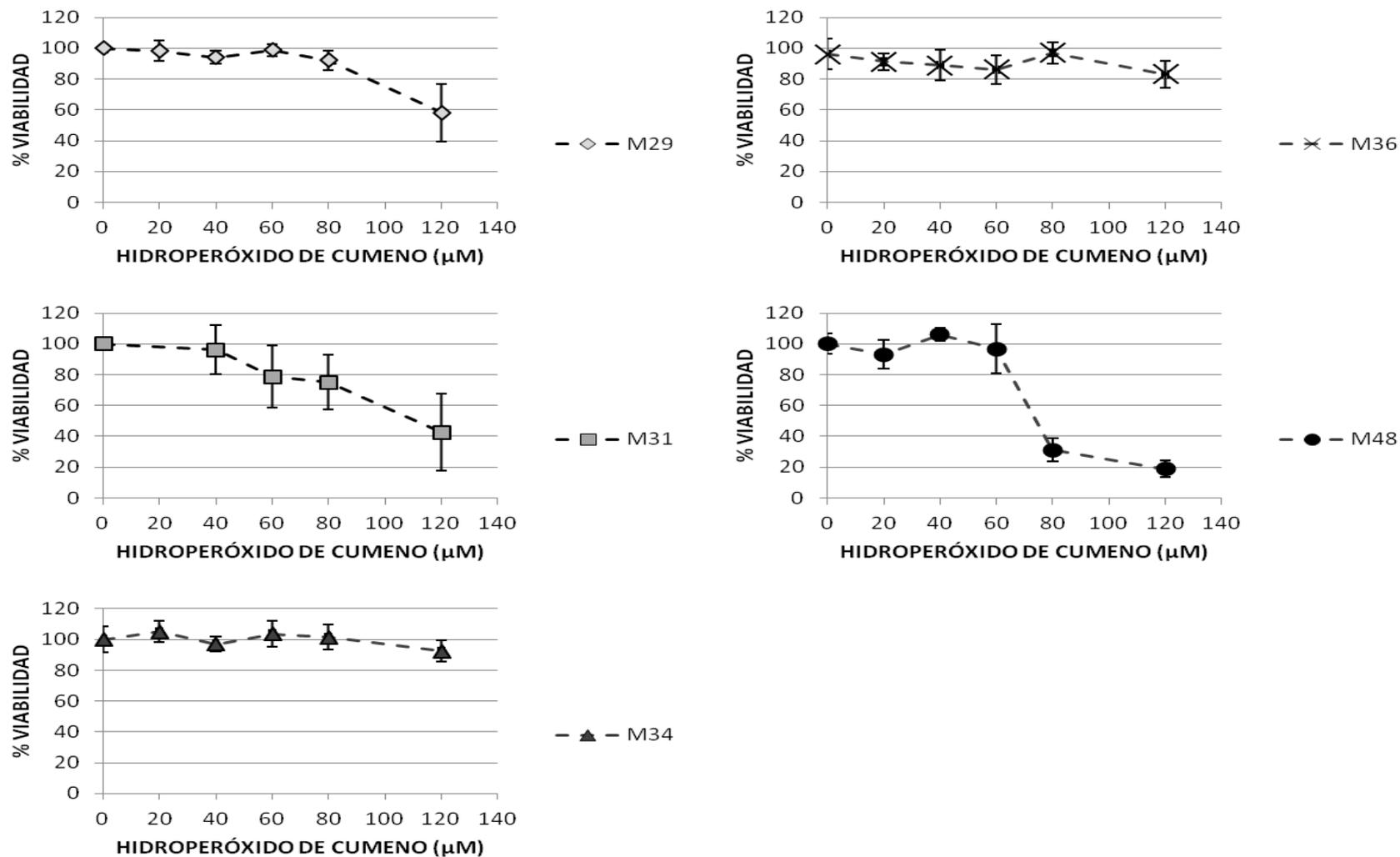
Si representamos todas las muestras en un diagrama de barras, para la dosis 40  $\mu\text{M}$  de MD (Figura 36A), la muestra con menor viabilidad es M36. Como contrapartida, la muestra M31 sería la más resistente, con una viabilidad de  $93,38 \pm 24,79\%$ , siendo significativamente diferente de las demás edades exceptuando M48, con una viabilidad de  $80,75 \pm 2,78\%$ . Para una dosis mayor, 80  $\mu\text{M}$  MD (Figura 36B), las muestras con menos viabilidad son M29, M34 y M36, con una viabilidad alrededor del 40%. La más resistente sería nuevamente M31, con una viabilidad del  $92,01 \pm 18,14\%$ . De estos resultados no puede concluirse que exista una correlación clara entre el efecto del estrés oxidativo y la edad.



**Figura 36. Efecto de MD en la viabilidad de las hADSCs de distintas edades.** **A:** Comparación entre las hADSCs de diferentes edades para la concentración fija 40  $\mu\text{M}$ . **B:** Dosis fija 80  $\mu\text{M}$ . Las letras A, B, C, D y E representan las hADSC de edades 29, 31, 34, 36 y 48 años, respectivamente. La significación estadística ( $p= 0,0001$ ) se indica con las letras a, b, c, d y e.



**Figura 35. Resistencia al estrés oxidativo (MD) de las hADSCs de diferentes edades.** Las gráficas representan la viabilidad, en porcentajes, resultante del ensayo MTS, frente a la concentración de MD, para las muestras hADSCs de diferentes edades.

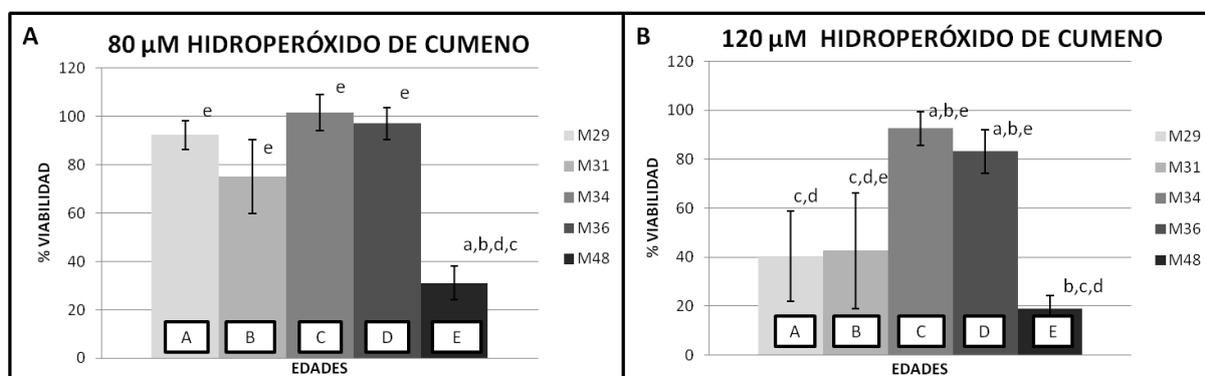


**Figura 37. Resistencia al estrés oxidativo (CH) de las hADSCs de diferentes edades.** Las gráficas representan la viabilidad en porcentajes, resultante del ensayo MTS, frente a la concentración de CH para las muestras hADSCs de diferentes edades.

### IV.4.1.3 Viabilidad con hidropéroxido de cumeno. Comparación con la edad

La sensibilidad de las hADSCs al estrés oxidativo inducido por acción de CH tampoco es igual para todas las edades (Figura 37) (véase pagina anterior).

Para dosis 80  $\mu\text{M}$  de CH, la viabilidad a todas las edades es, aproximadamente, la misma, sin diferencias significativas, salvo para M48, que muestra una disminución drástica de su viabilidad,  $31,12 \pm 7,49\%$ , significativamente diferente a las demás (Figura 38A). Si la dosis de CH sube hasta 120  $\mu\text{M}$  la viabilidad varía entre las edades, pero M48 sigue siendo la de menor viabilidad,  $18,76 \pm 5,37\%$  (Figura 38B). Las muestras M34 y M36 son la más resistentes a CH.



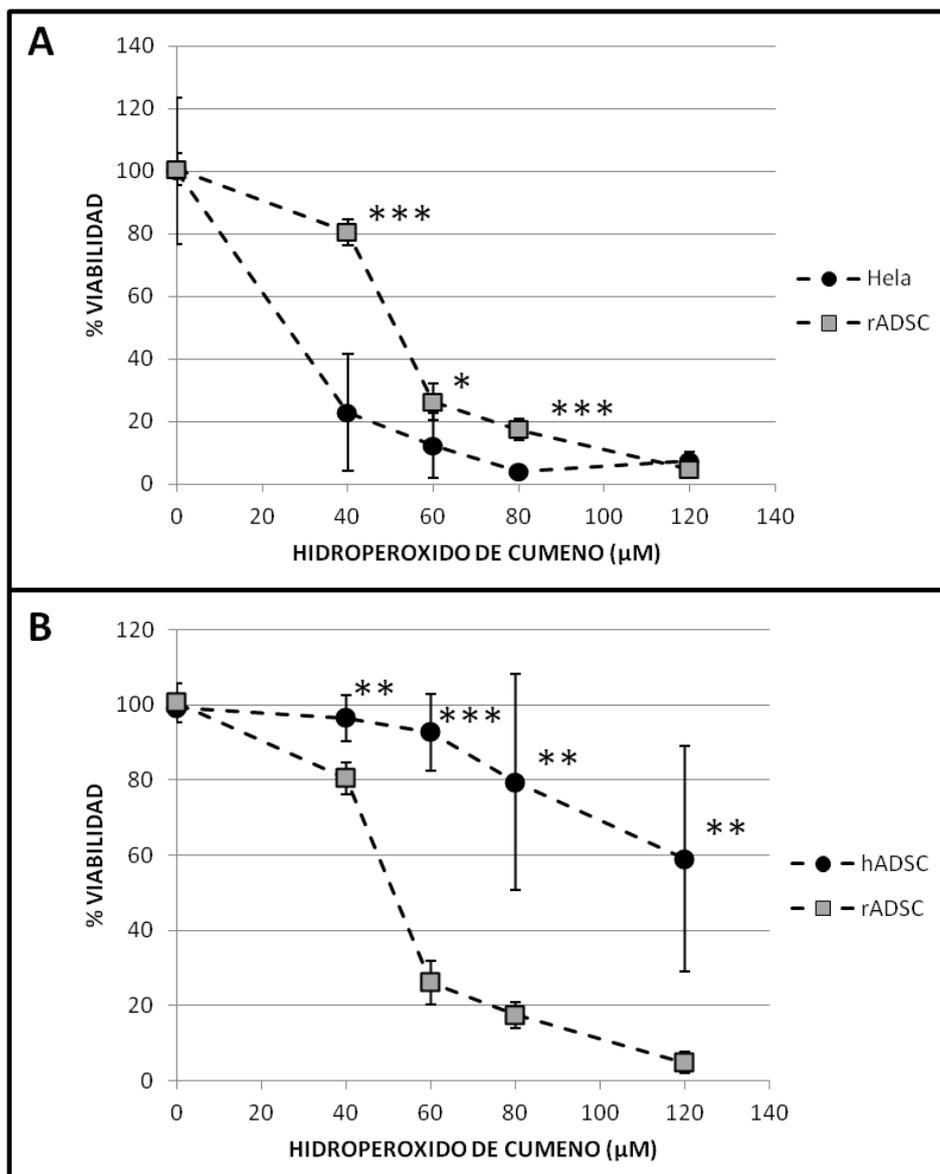
**Figura 38.** Efecto de CH en la viabilidad de las hADSCs de distintas edades. **A:** Comparación entre las hADSCs de diferentes edades para la concentración 80  $\mu\text{M}$ . **B:** Dosis 120  $\mu\text{M}$ . Las letras A, B, C, D y E representan las hADSC de edades 29, 31, 34, 36 y 48 años, respectivamente. La significación estadística ( $p= 0,0001$ ) se indica con las letras a, b, c, d y e.

## IV.4.2 Células rADSCs

### IV.4.2.1 Viabilidad con hidropéroxido de cumeno. Comparación con la línea celular HeLa y hADSC

Al igual que hicimos con las ADSCs, comprobamos primero la resistencia al estrés oxidativo de las rADSCs en comparación con la línea celular HeLa (Figura 39A).

Los resultados muestran que se produce una disminución progresiva de la viabilidad conforme aumenta la concentración del agente oxidante, que es más rápida y progresiva en el grupo de HeLa, llegando a una viabilidad de  $22,97 \pm 18,68\%$  para 40  $\mu\text{M}$  CH, mientras que para rADSCs la viabilidad aún es de  $80,58 \pm 4,21\%$  en esa concentración. Para todas las dosis utilizadas de CH, excepto para la más alta (120  $\mu\text{M}$ ), la diferencia entre ambas células es significativa, siendo las rADSCs siempre más resistentes al estrés oxidativo.



**Figura 39. Curva de viabilidad de resistencia al hidroperóxido de cumeno.** Las gráficas representan la viabilidad resultante del ensayo MTS frente a la concentración de hidroperóxido de cumeno, **A:** HeLa y rADSC. **B:** hADSC y rADSC. \*Significativo (N=5, p<0,05). \*\*Significativo (N=5, p<0,01). \*\*\*Significativo (N=5, p<0,001).

Si comparamos con las hADSCs, se observa que las rADSC son menos resistentes al estrés oxidativo (Figura 39B). Así, en las rADSCs comienza a disminuir drásticamente su viabilidad a 60 µM de CH (26,20 ± 5,83%), mientras que las hADSCs, a esa misma concentración, aún muestran 92,8 ± 10,16% de viabilidad y no es hasta 80 µM cuando comienza a bajar hasta 79,45 ± 28,80%. En todas las dosis ensayadas de CH la diferencia entre ambos tipos de células es significativa. Estos resultados muestran que las células madre, en general, son más resistentes al estrés oxidativo que la línea celular HeLa y las humanas son más resistentes que las de rata.

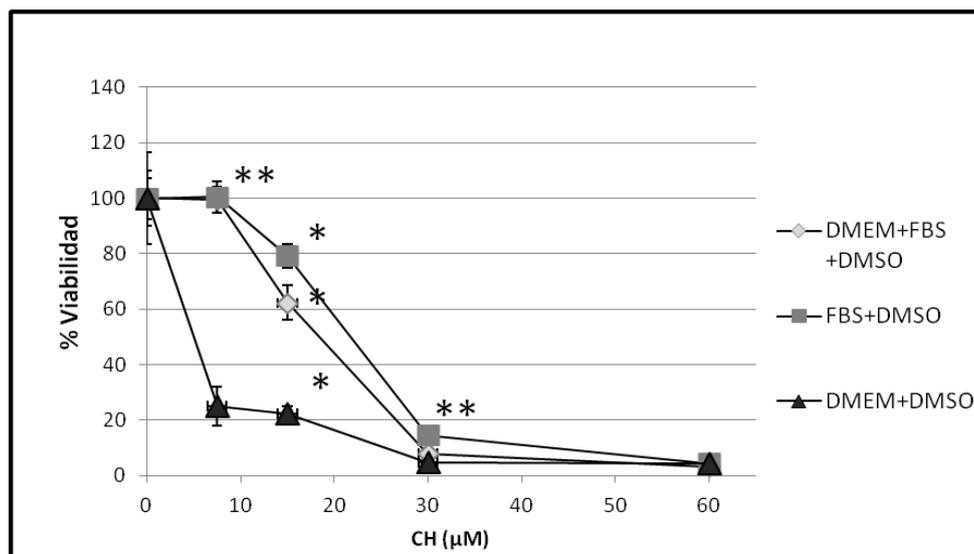
#### IV.4.2.2 Efecto del hidropéroxido de cumeno sobre la viabilidad de las rADSCs según el medio de criopreservación (dimetilsulfóxido, suero bovino fetal) y el tiempo transcurrido después de la descongelación

Como agente criopreservante se usó el dimetilsulfoxido (DMSO) a distintas concentraciones. Utilizando distintos niveles de hidropéroxido de cumeno (CH), 10-30 $\mu$ M, realizamos un ensayo de citotoxicidad (Tabla 8). Como podemos observar, a concentraciones bajas de oxidación prácticamente no existen diferencias entre las distintas concentraciones de agente crioprotector utilizadas. Sin embargo, a una dosis de 30  $\mu$ M de CH todos los resultados son diferentes entre sí, estableciéndose el 10% de DMSO como la concentración de agente crioprotector que produce mayor protección ante el CH tras la descongelación.

**Tabla 8. Porcentaje de Citotoxicidad (%):** Concentraciones de DMSO (v/v) ante la peroxidación por hidropéroxido de cumeno después de 2 días de cultivo tras el proceso de descongelación. \*Significativo ( $p=0,001$ ,  $N=5$ ).

Concentración ( $\mu$ M) de hidropéroxido de cumeno	Concentración (v/v) de DMSO		
	5%	10%	20%
10 $\mu$ M	16,6 $\pm$ 10,9	8,0 $\pm$ 5,6	19,0 $\pm$ 6,5
20 $\mu$ M	33,3 $\pm$ 11,0	34,6 $\pm$ 19,7	23,2 $\pm$ 15,0
30 $\mu$ M	73,4 $\pm$ 22,3*	29,9 $\pm$ 17,8*	50,4 $\pm$ 3,4*

Posteriormente, comprobamos si la presencia de suero (FBS) en el medio de cultivo podría favorecer la viabilidad ante el hidropéroxido de cumeno. Preparamos, para ello, 3 diferentes situaciones: DMEM+FBS+DMSO, FBS+DMSO, y DMEM+DMSO. Los resultados muestran (Figura 40) que se va produciendo una disminución progresiva de la viabilidad conforme aumenta la concentración del CH, pero es más rápida y progresiva en el grupo “DMEM+DMSO”, en la que para 7,5 $\mu$ M de CH, la viabilidad es 25,05  $\pm$  6,92%, mientras que para el resto de grupos la viabilidad aún es casi del 100%. Para una concentración 15  $\mu$ M de CH, es el grupo “FBS+DMSO” el que mayor resistencia presenta al estrés oxidativo. Estos resultados sugieren que la presencia de FBS es vital para la resistencia de las células a la peroxidación lipídica tras la congelación.



**Figura 40. Curva de viabilidad de resistencia al hidropéroxido de humeno en diferentes modalidades de criopreservación.** Las graficas representan la viabilidad resultante del ensayo MTS frente a la concentración de hidropéroxido de cumeno, para las diferentes condiciones de criopreservacion. \*Significativo entre todos los grupos, \*\*Significativo con respecto al grupo “DMEM+DMSO”.

Por otro lado, hemos comparado la resistencia al estrés oxidativo mediante peroxidación lipídica con CH en las células rADSCs después de la descongelación (2 días después de alcanzar la primera confluencia) y después de llevar un tiempo en cultivo (2 semanas después de la descongelación). Los resultados de la Figura 41A muestran que se produce un aumento progresivo de la citotoxicidad conforme aumentan la concentración del CH, y que sólo existen diferencias entre ambos grupos cuando usamos una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de CH, siendo el que llevaba mas tiempo en cultivo el que presenta más citotoxicidad. En cuanto a los resultados de la Figura 41B, se observa una disminución progresiva de la viabilidad conforme aumenta la concentración del CH, que es más rápida cuando las células llevaban 2 semanas en cultivo tras las descongelación. Mientras que las más recientemente descongeladas ofrecen una mayor resistencia a la peroxidación lipídica. Todos estos resultados sugieren que el mejor medio de criopreservacion es aquel que lleva añadido un 10% de DMSO y la máxima cantidad de suero (FBS) posible, para proteger a las células de daños por peroxidación lipídica. Y que en el caso del uso de las células madre para un posible trasplante sería más conveniente, pues, usarlas lo antes posible tras la descongelación, evitando los posibles efectos secundarios del DMSO con una adecuada dilución.

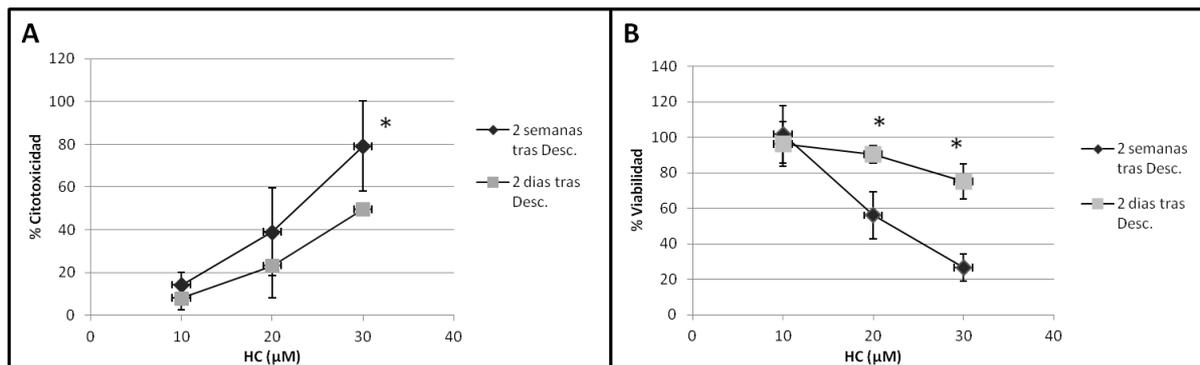


Figura 41. Curvas de citotoxicidad y viabilidad de resistencia al hidropéroxido de cumeno tras diferentes tiempos después de la descongelación. **A:** Citotoxicidad. **B:** Viabilidad, frente a la concentración de hidropéroxido de cumeno, para las diferentes condiciones de criopreservación. \*Significativo (N=4,  $p < 0,001$ ).

## IV.5 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* DE LAS RATAS CON HIDROPERÓXIDO DE CUMENO

Además del estudio *in vitro*, el efecto del CH sobre las ADSCs fue ensayado *in vivo* a unas dosis moderadas. El objetivo no es provocar un estado tóxico generalizado por estrés oxidativo, pues existen estudios que revelan que niveles elevados de estrés oxidativo conducen a senescencia (Vigneron and Vousden, 2010), apoptosis (Chaudhary *et al.*, 2010) y necrosis (Franklin, 2011), sino unos niveles moderados de estrés oxidativo, que se sabe que pueden provocar respuesta antioxidante (Tanito *et al.*, 2007), inhibición de la proliferación celular (Verbon *et al.*, 2012), autofagia (Hill *et al.*, 2008; Habertzettl and Hill, 2013) y diferenciación celular (Atashi *et al.*, 2015). Para ello, los animales se trataron con 40 y 80 mg/Kg de CH durante 30 días, como se describe en el apartado III.3.2 de Parte Experimental.

### IV.5.1 Efecto del tratamiento en el peso de los animales

El tratamiento prolongado con CH en animales provoca una disminución de la ganancia de peso con respecto al grupo control (Delgado-Cortés *et al.*, 2015). Tras el tratamiento de 30 días, los animales que fueron tratados con 80 mg/Kg de CH sufrieron una pérdida de

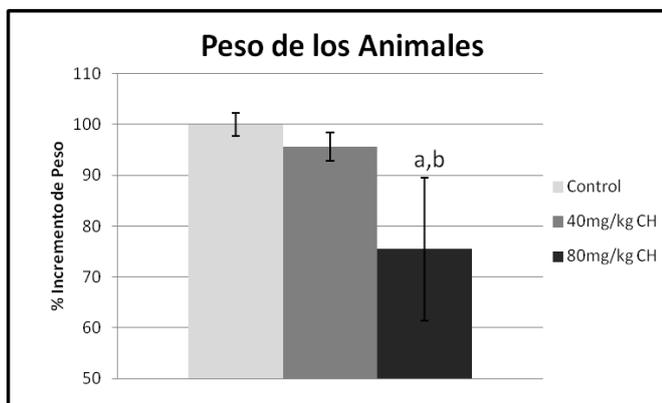
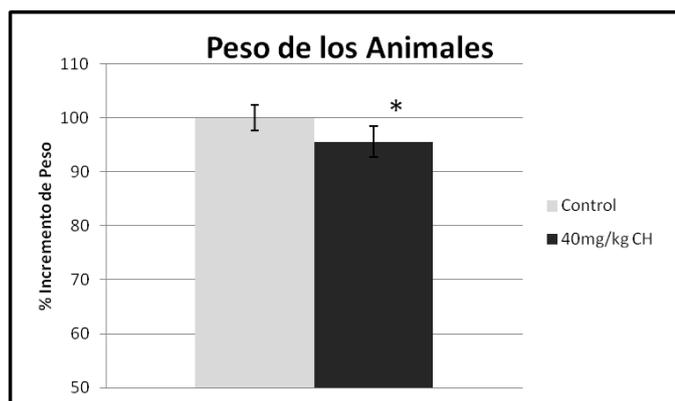


Figura 42. Peso de los animales desde que se inició el tratamiento con CH hasta el día 30. Diagrama de barras, donde cada valor obtenido es el porcentaje del incremento de los pesos  $\pm$  desviación, con respecto a la muestra control (N=4, para el grupo Salino y 80 mg/kg de CH; y N=5, para 40 mg/kg de CH). <sup>a</sup>Significativo ( $p=0,003$ ) respecto al grupo Control. <sup>b</sup>Significativo ( $p=0,003$ ) respecto al grupo 40 mg/kg de CH.

ganancia de peso considerable con respecto al control (Figura 42), pero no así el grupo tratado con 40 mg/Kg de CH. Si existen diferencias entre el grupo control y el tratado con 40 mg/kg de CH si los comparamos por separado (Figura 43), existiendo solamente un 5% de pérdida con respecto al grupo control.



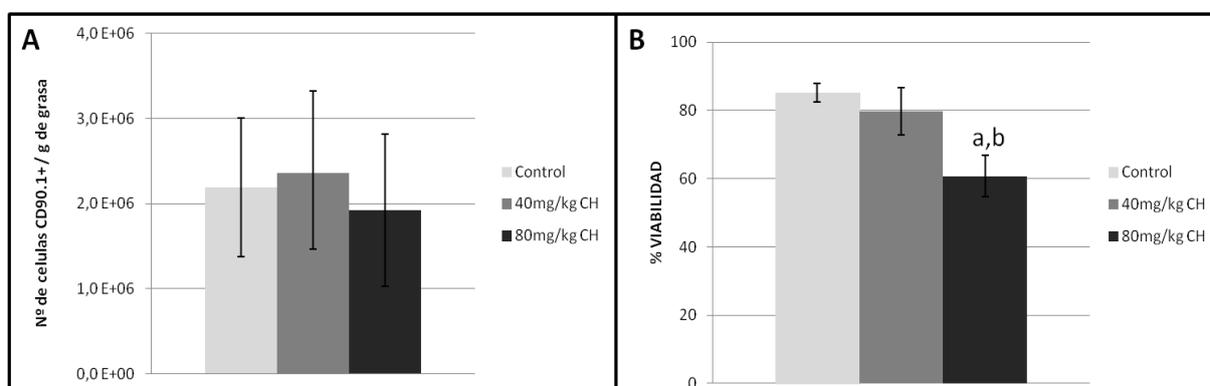
**Figura 43. Incremento del peso de los animales desde que se inició el tratamiento con CH hasta el día 30.** Diagrama de barras, donde cada valor obtenido es el porcentaje del incremento de los pesos  $\pm$  desviación estándar, con respecto a la muestra control (N=4, para el grupo salino; y N=5, para 40 mg/kg de CH). \*Significativo ( $p < 0,05$ ).

### IV.5.2 Ratios de aislamiento

Se sabe que el número de células madre disminuye con la edad

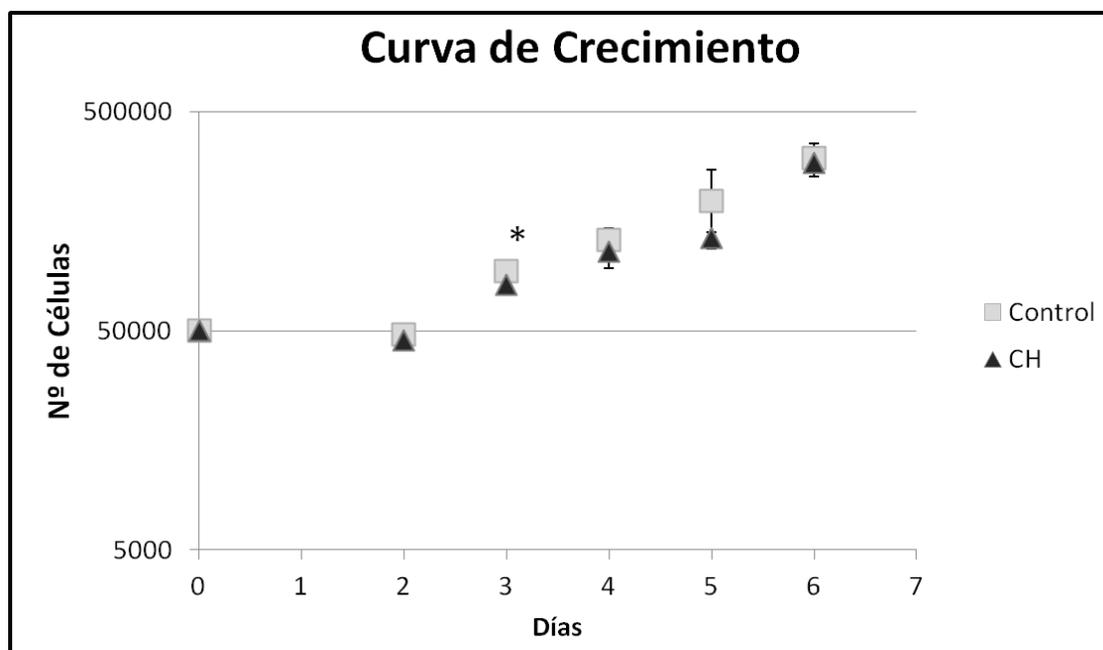
(Fehrer and Lepperdinger, 2005; Fehrer *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011) y lo hemos comprobado con las rADSCs de distintas edades. Así mismo, se midió si el número de rADSCs aisladas por gramo de tejido se ve afectada por el tratamiento con hidroperóxido de cumeno *in vivo*.

Se puede observar en la Figura 44A que el número de rADSCs por gramo de tejido no es alterado por el tratamiento con CH, existiendo unos valores de rADSCs que oscilan entre  $1,10 \times 10^6$ -  $3,07 \times 10^6$  células. Sin embargo, la viabilidad en las rADSCs aisladas a partir de los animales tratados con 80 mg/kg de CH es del  $60,75 \pm 6,07\%$ , valores significativamente ( $p < 0,001$ ) bajos con respecto a los grupos de control y tratados con 40 mg/kg de CH, con viabilidad de  $79,75 \pm 6,85\%$ , que no es significativamente diferente del grupo control (Figura 44B).



**Figura 44. Número de rADSCs aisladas tras la separación magnética. A:** Número de rADSCs aisladas por gramo de tejido adiposo, donde las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cada grupo experimental. **B:** % de Viabilidad de las rADSCs aisladas, donde las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cada grupo experimental (N=4). <sup>a</sup>Significativo ( $p < 0,001$ ) con respecto al grupo Control. <sup>b</sup>Significativo ( $p < 0,001$ ) con respecto al grupo 40 mg/Kg de CH.

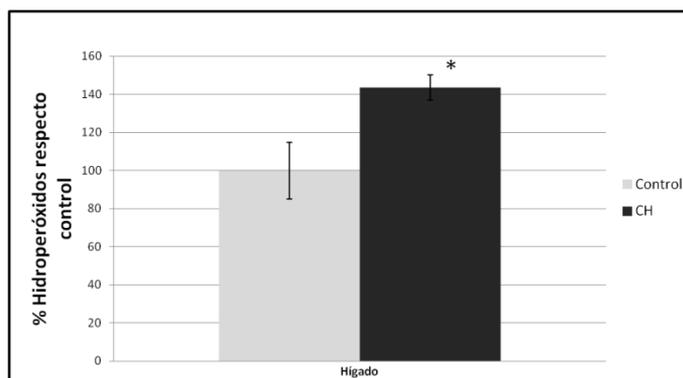
También se realizó una curva de crecimiento durante 6 días para evaluar posibles alteraciones en el crecimiento celular debido al CH administrado *in vivo*. Como se puede apreciar en la Figura 45, no existen diferencias significativas en el crecimiento de ambos grupos.



**Figura 45.** Curva de crecimiento de las rADSCs cultivadas tras el tratamiento *in vivo* con CH. La gráfica representa el número de células totales de cada grupo experimental frente al número de días que estuvieron en cultivo. \*Significativo ( $p=0,006$ ;  $N=4$ ).

### IV.5.3 Peroxidación lipídica en extractos de hígados de rata

Para comprobar que el tratamiento con 40mg/Kg de CH durante 30 días ha provocado un estado de estrés oxidativo en el organismo, es necesario determinar los niveles de peroxidación lipídica en extracto hepático mediante el método FOX (Jiang *et al.*, 1991).

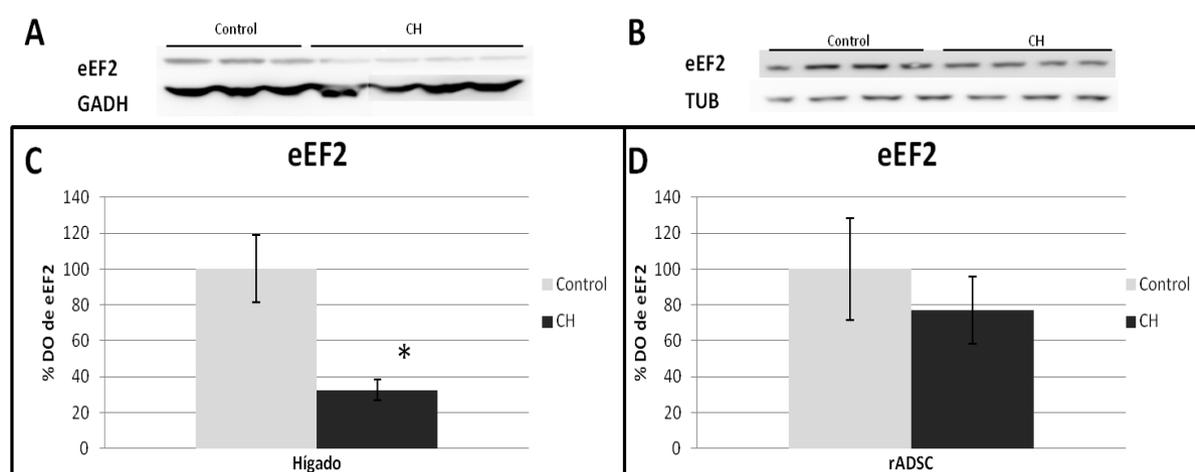


**Figura 46.** Contenido de hidroperóxidos en extractos hepáticos tras tratamiento con 40 mg/kg durante 30 días. Los resultados representan el porcentaje de nmoles de hidroperóxidos dividido por la cantidad total de proteínas en gramos, de cada muestra considerando la muestra control como el 100%. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $N=3$ , para el grupo Control; y  $N=4$  para el grupo de 40 mg/kg de CH). \*Significativo ( $p=0,003$ ).

Los resultados obtenidos (Figura 46) indican que los extractos hepáticos de los animales tratados con 40 mg/kg de CH contienen un 43,7 % más de hidroperóxidos que el control.

#### IV.5.4 Variaciones de los niveles de proteínas implicadas en rutas bioquímicas de longevidad

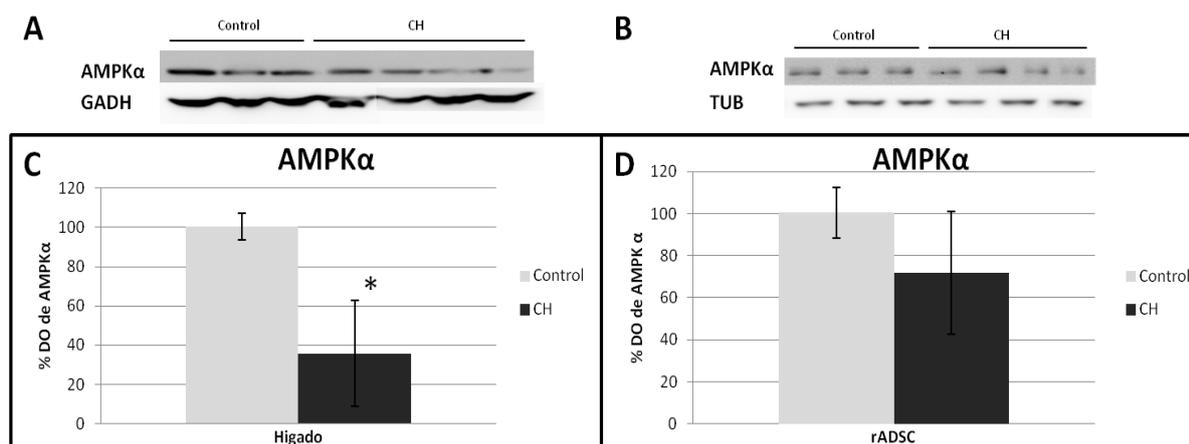
Como hemos mencionado anteriormente el objetivo del tratamiento *in vivo* con CH es comprobar si el estrés oxidativo tiene repercusiones en la homeostasis proteica, la potencialidad y la diferenciación de las rADSCs. Aunque la influencia del estrés oxidativo en los procesos biológicos importantes han sido muy estudiadas (Tanito *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2010; Vigneron and Vousden, 2010; Franklin, 2011; Verbon *et al.*, 2012; Habertzettl and Hill, 2013), no se ha llevado a cabo con profundidad en células madre. Si el objetivo es usar las rADSCs en terapias celulares es necesario conocer la respuesta de esas células al estrés oxidativo, ya que su acción la van a realizar en lugares con elevadas cantidades de ROS, como son los tejidos dañados por inflamación, necrosis, degeneración, etc (Sorolla *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010b; Sorolla *et al.*, 2012; de Pablos *et al.*, 2014b; Hu *et al.*, 2014; García-Olmo *et al.*, 2015). Por ello, diferentes proteínas, como eEF2, AMPK $\alpha$ , SIRT1 y PGC1 $\alpha$  se han estudiado, en rADSCs tratadas con CH, comparando los resultados obtenidos en extractos hepáticos.



**Figura 47. Resultados del análisis mediante WB de eEF2 en hígado y en rADSCs tratadas con CH.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas eEF2 (95 kDa) y GADH (37kDa), como control de carga, en extractos de hígados (N=3, para grupo Control; y N=4; para el grupo CH). **C:** Diagrama de barras en el que cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar, donde se establece como 100% el grupo Control. **B y D:** Se lleva a cabo de la misma manera, pero las muestras proceden de las células rADSCs y la proteína de control de carga es  $\alpha$ Tub (52kD). \*Significativo ( $p=0,001$ ; N=4).

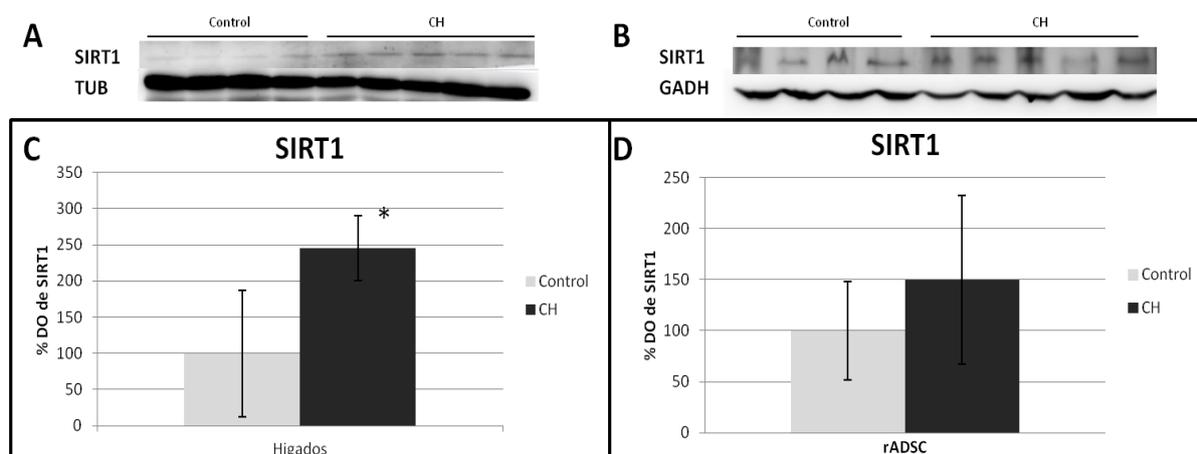
En los extractos hepáticos se observa que el eEF2 disminuye significativamente en los animales tratados con CH (Figuras 47A y C). Este resultado confirma los obtenidos en los apartados IV.5.1 y IV.5.3 de Resultados, y también por otros autores (Argüelles *et al.*, 2009). Sin embargo, los niveles de eEF2 de las rADSCs, aunque tienden a disminuir, no son estadísticamente significativos (Figura 47D).

En relación a la proteína AMPK $\alpha$ , en hígado sus niveles se encuentran disminuidos significativamente en un 65% con respecto al grupo control (Figuras 48A y C). Estos resultados exhiben una tendencia similar a los que observamos en el apartado IV.3.3.2 de Resultados, donde los animales de 24 meses tenían niveles mucho menores de AMPK $\alpha$  que los de edad adulta (9 meses). Por el contrario, en las rADSCs se aprecia una disminución del 29% en los tratados con respecto al grupo control, aunque esta diferencia no es significativa (Figura 48D).



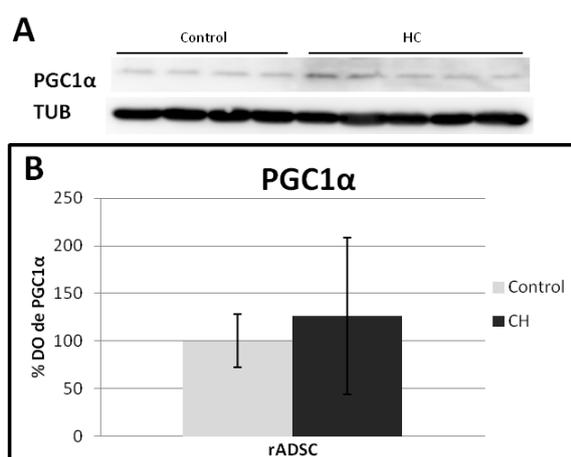
**Figura 48. Resultados del análisis mediante WB de AMPK $\alpha$  en hígado y en rADSCs tratadas con CH.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas AMPK $\alpha$  (62 kDa) y GADH (37kDa), como control de carga, en extractos de hígado (N=3, para grupo Control; y N=4, para el grupo CH). **C:** Diagrama de barras en el que cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar, donde se establece 100% al grupo Control. **B y D:** Se lleva a cabo de la misma manera, pero las muestras son procedentes de las células rADSCs y la proteína de control de carga es  $\alpha$ Tub (52kD) (N=3, para grupo Control; y N=4, para el grupo CH). \*Significativo (p=0,011).

Se ha estudiado también la proteína SIRT1. Los resultados muestran que SIRT1 aumenta un 155% en el tejido hepático de los animales tratados con CH (Figura 49). Aunque esté ampliamente descrito en la bibliografía que elevados niveles de estrés oxidativo disminuyen SIRT1 (Haberzettl and Hill, 2013; Ido *et al.*, 2015), otros autores han descrito que niveles bajos de estrés oxidativo inducen la expresión de enzimas antioxidantes (Ayala *et al.*, 2014). Por otro lado, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los niveles de SIRT1 en las rADSCs (Figura 48D).



**Figura 49. Resultados del análisis mediante WB de SIRT1 en hígado y en rADSCs tratadas con CH.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas SIRT1 (120 kDa) y GADH (37kDa) como control de carga, en extractos de hígado, (N=4, para grupo Control; y N=5, para el grupo CH). **C:** Diagrama de barras en el que cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar, donde se establece 100% al grupo Control. **B y D:** Se lleva a cabo de la misma manera pero las muestras son procedentes de las células rADSCs (N=4). \*Significativo ( $p=0,014$ ).

También se midieron los niveles de PGC1 $\alpha$ , relacionada con las proteínas comentadas anteriormente, pero el resultado muestra que no existen diferencias estadísticas entre los grupos (Figura 50).

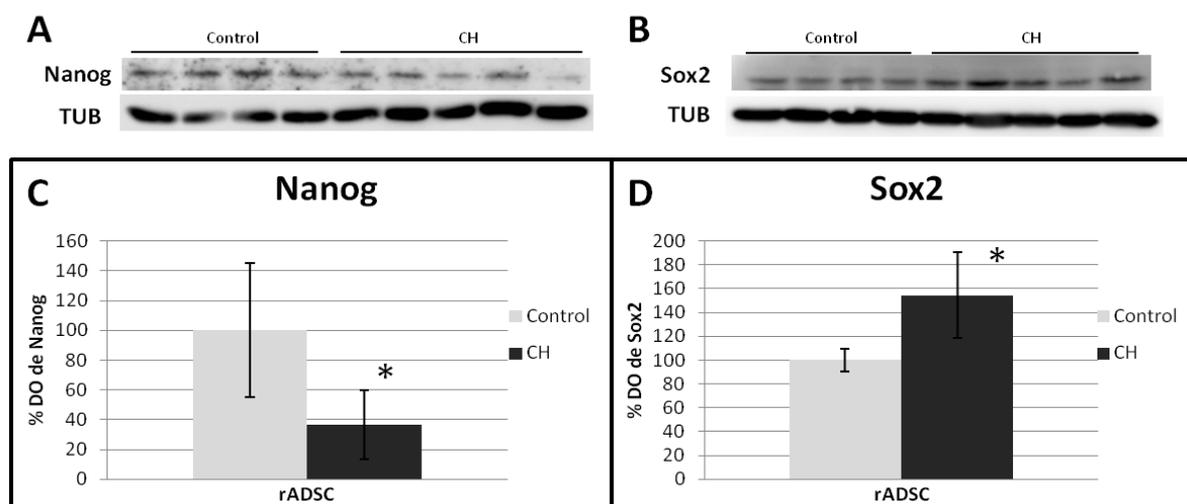


**Figura 50. Resultados del análisis mediante WB de PGC1 $\alpha$  en rADSCs tratadas con CH.** **A:** Imágenes tomadas de las bandas PGC1 $\alpha$  (120 KDa) y  $\alpha$ Tub (52 KDa) como control de carga, de las muestras (N=4). **B:** Diagrama de barras en el que cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar, donde se establece 100% del grupo Control.

#### IV.5.5 Evaluación de la potencialidad de las rADSCs mediante la determinación de los niveles de las proteínas Nanog y Sox2 en el tratamiento *in vivo* con CH

Las proteínas Nanog y Sox2, que se han empleado como indicador de potencialidad en otros experimentos (Siegel *et al.*, 2013; Carelli *et al.*, 2014), fueron determinadas en rADSCs tras el tratamiento *in vivo* con CH.

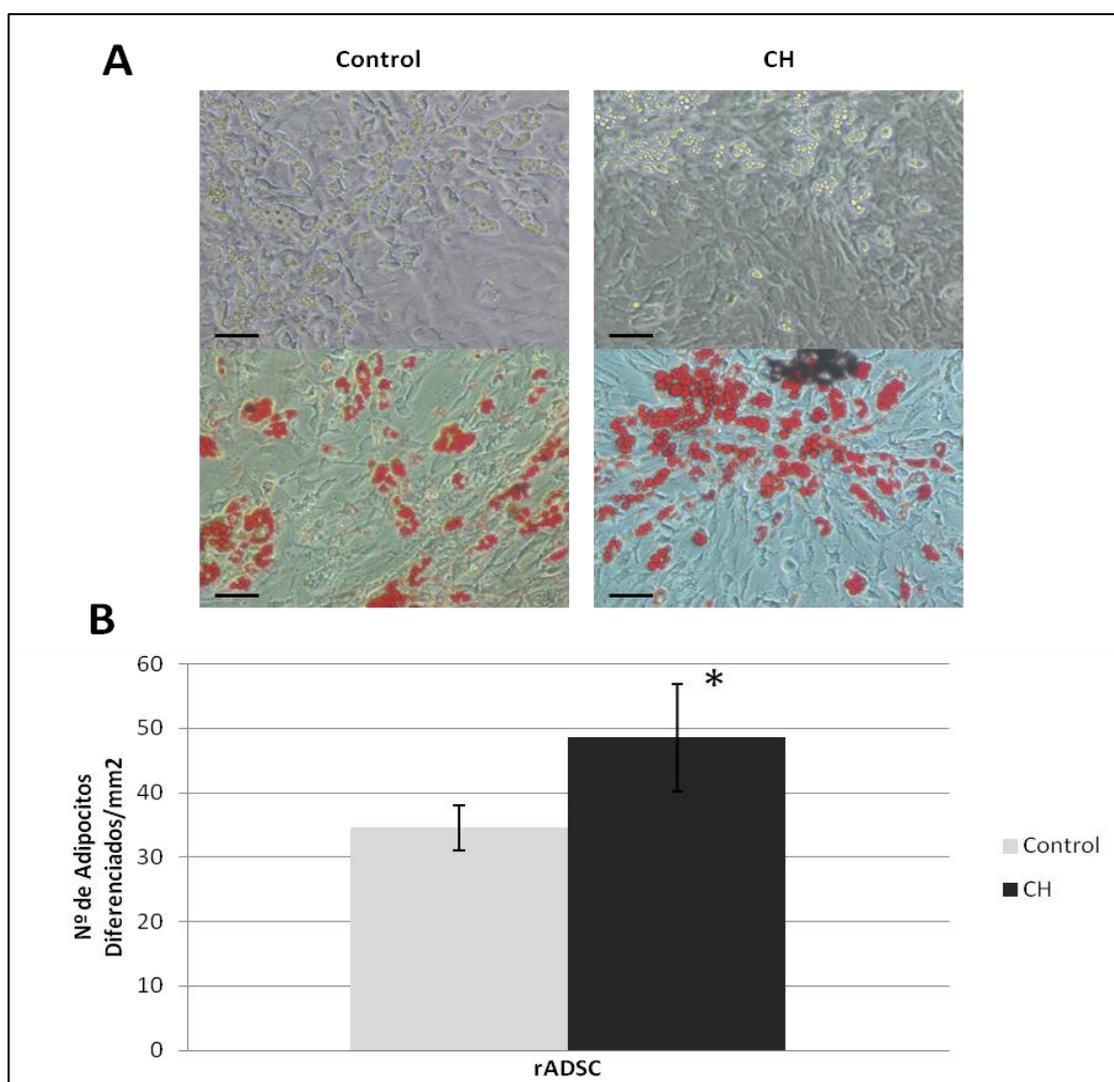
Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre los grupos control y tratados para ambas proteínas, no comportándose de la misma manera. Mientras que Nanog disminuye en los animales tratados, un 64% con respecto al control (Figura 51C), Sox2 aumenta un 54% (Figura 51D). Estos resultados indican que el estrés oxidativo, provocado por el tratamiento con CH, está disminuyendo la potencialidad de las rADSCs, ya que, por un lado, Nanog disminuye, lo que se podría traducir como un desequilibrio en el control de los mecanismo de auto-renovación que mantienen la potencialidad de las ADSC, y por otro, Sox2 aumenta, cuya potencialidad se encuentra muy relacionada con la capacidad de diferenciación en las vías osteogénicas y adipogénicas (Seo *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2014).



**Figura 51. Resultados del análisis mediante WB de las proteínas indicadoras de pluripotencialidad Nanog y Sox2 en rADSCs tratadas con CH.** A y B: Imágenes tomadas de las bandas de Nanog (28-36 kDa) y Sox2 (35 kDa), respectivamente, además de  $\alpha$ Tub (52kDa), como control de carga, (N=4, para grupo Control; y N=5, para grupo CH). C y D: Diagramas de barras en el que cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica  $\pm$  desviación estándar, donde se establece 100% el grupo control. C: \*Significativo ( $p=0,028$ ). D: \*Significativo ( $p=0,025$ ).

#### IV.5.6 Cuantificación de la diferenciación hasta adipocitos de las rADSCs

Dado que los niveles de Sox2 aumentan en los animales tratados con CH, comprobamos si el consiguiente aumento de potencialidad se traduce en una mayor diferenciación o, por el contrario, las células permanecen indiferenciadas. Los resultados obtenidos muestran que un tratamiento *in vivo* de 40 mg/kg de CH durante 30 días origina un aumento significativo ( $p=0,021$ ) de la diferenciación de las rADSCs hasta adipocitos con un 40% de aumento de células diferenciadas (Figuras 52A y 52B).

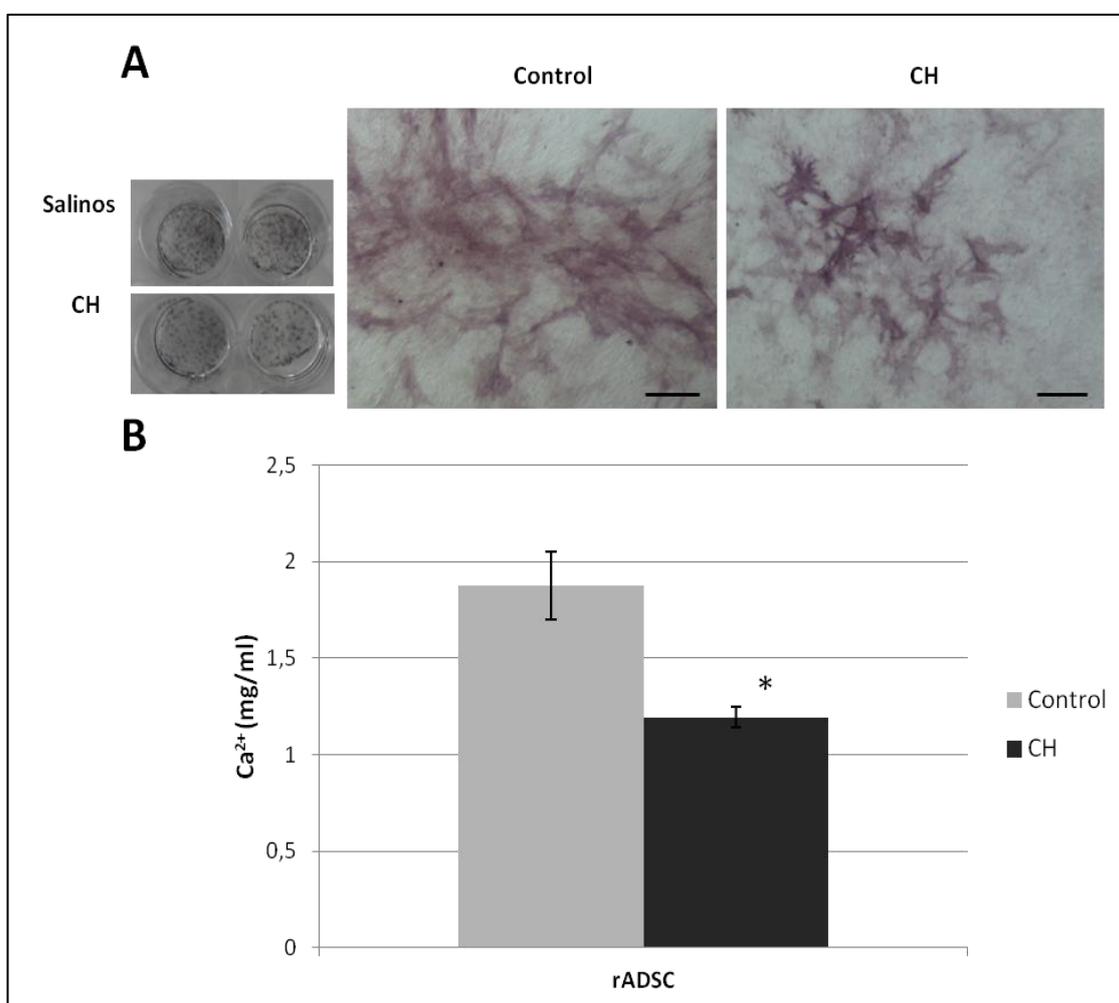


**Figura 52. Cuantificación de la diferenciación hasta adipocitos, mediante conteo, en rADSCs tratadas con CH *in vivo*.** A: Imágenes tomadas como representación de los grupos Control y CH. Las imágenes superiores son los adipocitos antes de teñir y las imágenes inferiores después de la tinción con Red Oil O. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo de 10x. La barra negra indica un diámetro de 100 $\mu$ m. B: Diagramas de barras que representan el nº de adipocitos/mm<sup>2</sup>  $\pm$  desviación estándar. \*Significativo ( $p=0,021$ ) (N=4).

#### IV.5.7 Cuantificación de la diferenciación hasta osteoblastos de las rADSCs

Una vez comprobado que niveles altos de Sox2 van acompañados de un aumento en el número de adipocitos en los animales tratados con CH cuando reciben un estímulo diferenciador adipogénico, y teniendo en cuenta que Sox2 está implicada en las rutas adipogénica y osteogénica, se cuantificó también si el CH afectaba a la diferenciación a osteoblastos.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento *in vivo* con 40 mg/kg de CH durante 30 días produce una disminución en la diferenciación de las rADSCs hasta osteoblastos. Así el grupo tratado con CH tiene un 36,3% menos de calcio con respecto al grupo control (Figura 53B).



**Figura 53. Cuantificación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> tras diferenciación hasta osteoblastos de las rADSCs tratadas con CH *in vivo*.** **A:** Imágenes tomadas como representación de los grupos de osteoblastos teñidos. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo de 10x. La barra negra indica un diámetro de 50µm. **B:** Diagramas de barras que representan la concentración de Ca<sup>2+</sup> en mg/ml ± desviación estándar (N=3, para controles; y N=4, para tratados con CH). \*Significativo (p= 0,001).

## IV.6 APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO EN TERAPIA CELULAR

### IV.6.1 Método de seguimiento de las rADSCs

Para estudiar la capacidad terapéutica de las rADSC es necesario contar con un método de seguimiento *in vivo* que nos ayuden a obtener información sobre su comportamiento celular tras el trasplante. Ese sistema consiste en la incorporación en el genoma de una secuencia que va a dar lugar a la expresión de la proteína fluorescente “green fluorescent protein” (GFP) y otra que cataliza una reacción luminiscente, la luciferasa (Luc).

### IV.6.2 Confirmación de la transfección del plásmido pSIN-Dual-Luciferasa-GFP2 en las rADSCs

Para el posible seguimiento de las rADSCs administradas *in vivo*, se utilizó un lentivirus portador del plásmido pSIN-Dual-Luciferasa-GFP2. Este plásmido es una derivación del pSIN-Dual al que se le ha introducido la luciferasa bajo el control del promotor SFFV, manteniendo la GFP original bajo el promotor UBIQ (Figura 54). Las células infectadas con este virus expresan luciferasa de luciérnaga y GFP, actuando como genes indicadores. Las células transfectadas, según se ha indicado en el apartado III.4.21 de Parte Experimental, alcanzaron la confluencia en 2 días. Una vez levantadas y en suspensión, se determinó el porcentaje de células transfectadas por citometría de flujo.

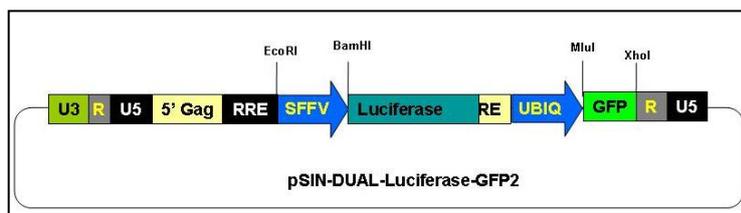
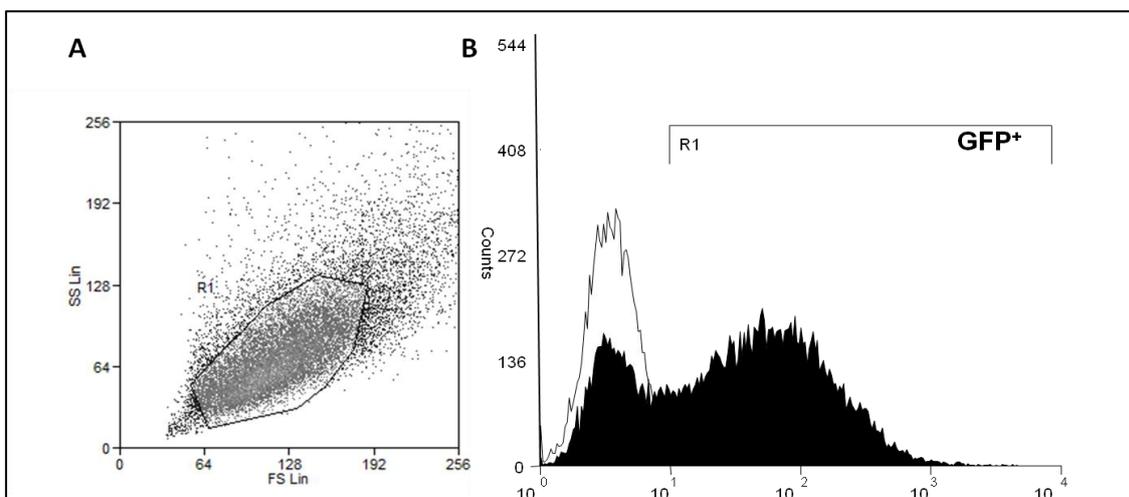


Figura 54. Representación del plásmido transfectado en las rADSC mediante partículas lentivirales

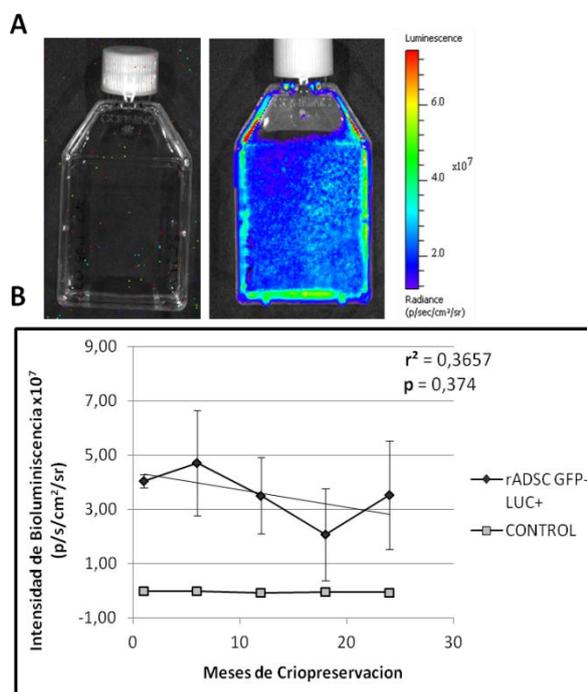
Se considera como muestra representativa la región (R1) que se encuentra acotada en torno a la nube de eventos. Para nuestra muestra, la población que se analizó fue el 77,44% de todos los eventos registrados (Figura 55A). En el histograma de la Figura 55B se representan el número de eventos contados frente al canal de emisión expuesto. En nuestro caso, el canal de fluorescencia FL1 está programado para detectar a GFP, por tanto, dicho canal FL1 nos ofrece información sobre el número de células que expresan GFP (GFP<sup>+</sup>). La titulación de células determinó un 68,81 % de células GFP<sup>+</sup>. Los resultados muestran que los niveles de intensidad de fluorescencia no son muy elevados pues la mayoría de la población positiva se

encuentra en órdenes de fluorescencia entre  $10^1$ - $10^2$ . Tampoco existe una separación total entre ambas poblaciones.



**Figura 55. Diagrama de dispersión de puntos e histograma de titulación para GFP.** A: Representación gráfica de la complejidad celular (SS Lin) frente al tamaño celular (FS Lin) de las rADSCs. R1 acota la región considerada para el análisis. B: Histograma correspondiente de la región R1, del canal de fluorescencia FL1, para GFP. Los valores del eje “x” y del eje “y” están como unidades relativas.

A continuación, las células cultivadas en un frasco T25 fueron sometidas a las pruebas de actividad de la enzima luciferasa, administrando 0,3 ml de D-Luciferina (3 mg/ml). Se tomaron imágenes antes y después de la administración de D-Luciferina en el cultivo para confirmar que no existe autoluminiscencia previa (Figura 56A). Los resultados obtenidos muestran que la intensidad bioluminiscente de un cultivo de rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup>, al 80 % de confluencia, durante 3 segundos de exposición, es de  $3.933 \times 10^7$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr. Si realizamos la misma medida cada vez que descongelamos un vial, en el que las células han permanecido criopreservadas durante largos periodos de tiempo, observamos que

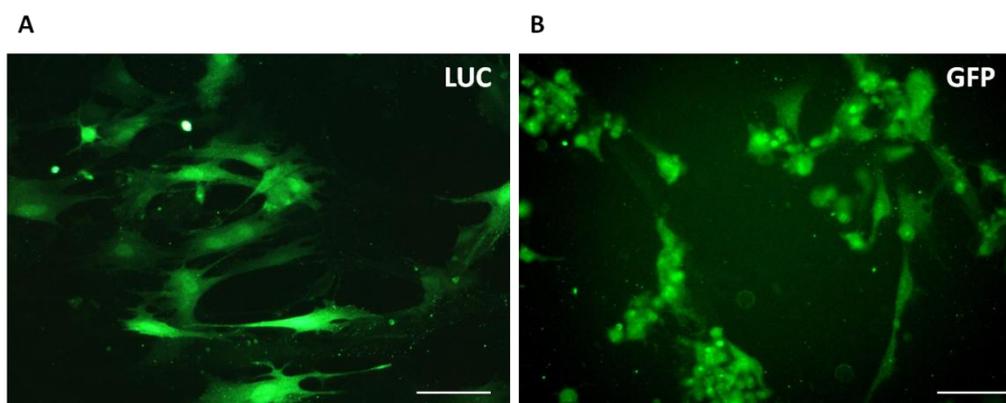


**Figura 56. Medida de la actividad de la Luciferasa en las rADSCs transfectadas con lentivirus.** A: Frascos T25 cultivados con rADSCs-GFP-LUC<sup>+</sup>, antes y después de la adición de 0,3 ml de D-Luciferina (3 mg/ml), durante 3 segundos de exposición. B: Intensidad de bioluminiscencia frente al tiempo de permanencia en criopreservación. Coeficiente de correlación de Pearson,  $r^2=0,366$  ( $p=0,374$ ).

existen oscilaciones, pero no aparece en ninguno de los casos una correlación ( $r^2= 0,366$ ) que nos indique que la bioluminiscencia disminuya con el tiempo de criopreservación (Figura 56B). La intensidad de bioluminiscencia es proporcional al número de células que expresan luciferasa, tanto si se obtiene la medida *in vitro* como *in vivo* (Aswendt *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015b), aunque la intensidad sí puede variar según el promotor asociado al gen (Mao *et al.*, 2015).

Se ha intentado visualizar GFP en las rADSCs transfectadas tras la fijación del tejido, o de las células, pero no hemos conseguido tener resultados satisfactorios, probablemente debido a que las proteínas fluorescentes son muy sensibles a los métodos de fijación (Tsien, 1998; Dower *et al.*, 2007; Patterson, 2007).

Gracias a la incorporación del plásmido pSIN-Dual-Luciferasa-GFP2 podemos realizar un seguimiento a las rADSCs en tejidos y cultivos *post mortem* mediante el uso de anticuerpos específicos para GFP y luciferasa.



**Figura 57. Inmunofluorescencia de las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> *in vitro*.** Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia y objetivo 20x. **A:** Inmunofluorescencia para luciferasa. **B:** para GFP. Las barras blancas en el margen inferior derecho miden 50  $\mu$ m.

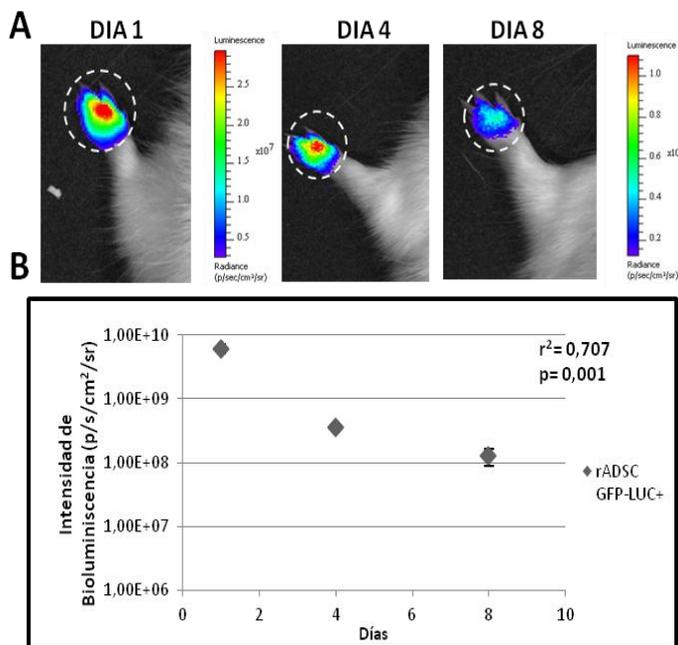
Prueba de ello son las imágenes de la Figura 57, en las que se muestra que las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> se pueden detectar usando anticuerpos específicos, tanto para luciferasa como para GFP. Si bien ambos anticuerpos se podrían usar individualmente, se decidió usar sólo el anticuerpo para luciferasa.

Como puede verse en la Figura 57 la inmunofluorescencia realizada para luciferasa tiene una mejor resolución de la estructura celular (Figura 57A) que la imagen obtenida para GFP (Figura 57B), posiblemente debido a que el método de fijación utilizado para GFP no fuese el más adecuado, presentando filtraciones al exterior de la célula. Por otra parte, puede

ocurrir que GFP tenga una menor expresión, debido a su promotor UBIQ. Aunque el promotor que expresa el gen de la luciferasa (SVVF) tampoco es de lo más potentes (Mao *et al.*, 2015), aun así parece ofrecer mejores resultados.

### IV.6.3 Seguimiento “*in vivo*” de las rADSCs-GFP-Luc+ tras implante local y sistémico

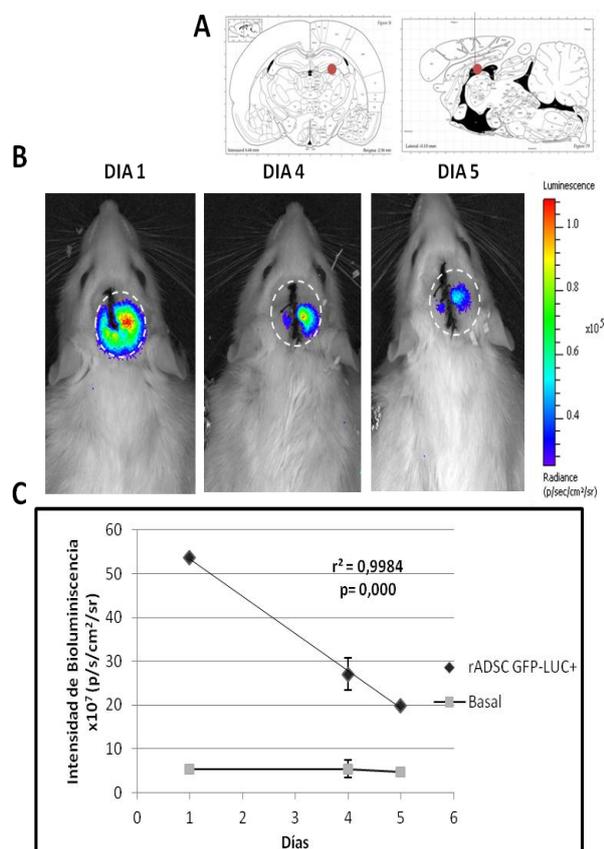
Las células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> fueron implantadas a nivel local, en patas, SNC, intrahepática (i.h.), en hígado y de forma sistémica a través de la vena caudal. Cuando realizamos el implante en la zona ventral de las patas (Figura 58A), se implantaron  $3 \times 10^5$  células y se midió la intensidad de la bioluminiscencia durante 30 s. La intensidad de la señal tras 24 h del implante fue  $6,09 \times 10^9 \pm 9,51 \times 10^8$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr, pero al cuarto día disminuyó



**Figura 58. Intensidad de bioluminiscencia de células inyectadas en las patas. A:** Imágenes tomadas con la cámara CCD tras el implante de  $3 \times 10^5$  células, con exposición de 30 s y tras inyección i.p. de D-Luciferina (3mg/Kg). **B:** Intensidad de bioluminiscencia frente al tiempo. Coeficiente de correlación de Pearson  $r^2=0,707$  ( $p=0,001$ ) (N=3).

hasta  $3,57 \times 10^8 \pm 2,79 \times 10^7$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr, (Figura 58B). Entre el cuarto y octavo día solo disminuye un 35,8%. La disminución de la señal es correlativa con el tiempo, presentando un coeficiente de correlación de 0,707. Hay estudios que sugieren que la respuesta inmunitaria creada puede destruir la mayoría de las células (Coyne *et al.*, 2006; Poncelet *et al.*, 2007; Zangi *et al.*, 2009), no siendo suficientes para ser

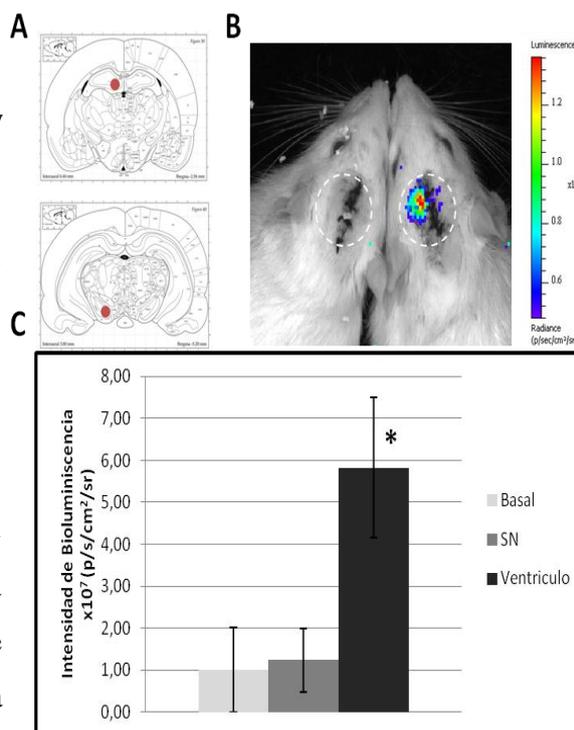
**Figura 59. Intensidad de la bioluminiscencia de células inyectadas en Ventriculo derecho. A:** Cortes coronales y sagitales donde se ha realizado el implante (Imágenes tomadas de Paxinos y Watson). **B:** Imágenes tomadas con la cámara CCD tras el implante de  $3 \times 10^5$  células, con exposición de 300 s, tras inyección i.p. de D-Luciferina (3 mg/Kg). **C:** Intensidad de bioluminiscencia frente al tiempo. Coeficiente de correlación de Pearson  $r^2=0,998$  ( $p=0,0001$ ) (N=2).



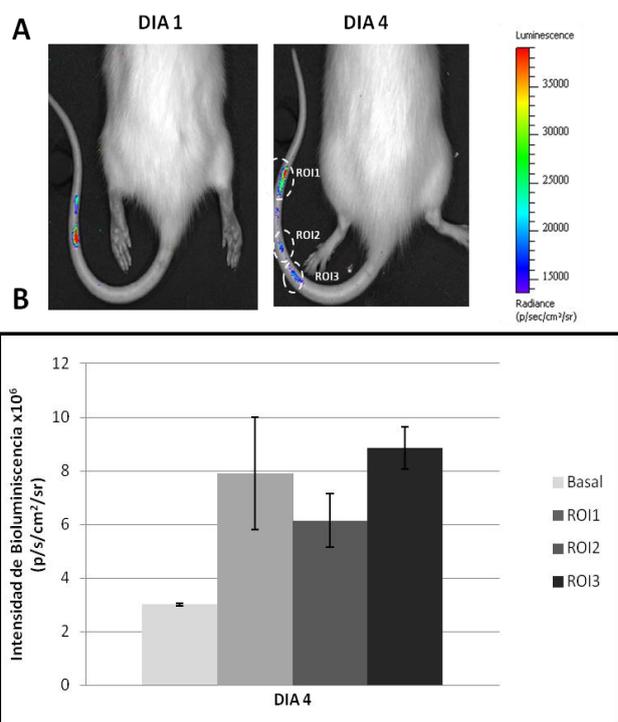
detectadas. En tal caso tenemos que recurrir a técnicas inmunológicas *ex vivo* para continuar el seguimiento de las células que sobreviven y maduran (Coyne *et al.*, 2006).

El mismo comportamiento presentan las células cuando se implantan en el SNC. En este caso en el ventrículo derecho del cerebro (Figura 59A) la intensidad bioluminiscente disminuye un 60% desde el primer al quinto día, acercándose progresivamente a los valores basales (Figura 59C). Esta disminución progresiva puede deberse también a fenómenos de respuesta inmunitaria o al hecho de haber introducido una menor cantidad de células.

Si introducimos menos células y en otras regiones del SNC como, por ejemplo, en hipocampo (HP) y sustancia nigra (SN), la señal se hace aún más débil (Figuras 60A y B),



**Figura 60. Intensidad de bioluminiscencia de células inyectadas en HP y SN.** A: Cortes coronales donde se ha realizado el implante (Imágenes tomadas de Paxinos y Watson). B: Imágenes tomadas con la cámara CCD tras el implante de  $1 \times 10^5$  células en HP, y  $3 \times 10^4$  células en SN, con exposición de 10 min, tras inyección i.p. de D-Luciferina (3 mg/Kg). C: Intensidad de bioluminiscencia en las distintas zonas. \*Significativo ( $p=0,011$ ) (N=3).

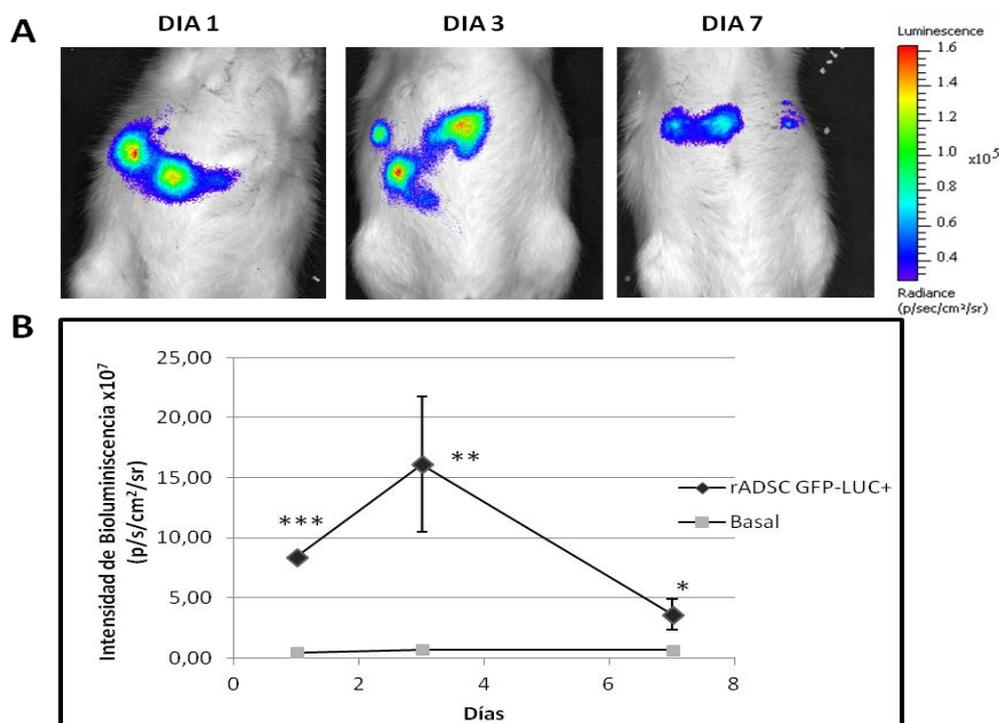


desapareciendo en pocos días. Las  $1 \times 10^5$  células inyectadas en hipocampo emiten  $5,83 \times 10^7 \pm 1,68 \times 10^7$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr, para un tiempo de exposición elevado de 10 min, tiempo que resulta insuficiente con todo para que  $3 \times 10^4$  células den señal en sustancia nigra (SN), alcanzando valores similares a la intensidad basal (Figura 60C).

**Figura 61. Intensidad de bioluminiscencia de células inyectadas por vía i.v.** A: Imágenes tomadas con la cámara CCD tras el implante de  $1 \times 10^6$ , a las 24 h y a los 4 días, con un tiempo de exposición de 5 min. tras inyección i.p. de D-Luciferina (3 mg/Kg). B: Intensidad de bioluminiscencia de distintas áreas de la cola. \*Significativo ( $p=0,006$ ; N=2)

En cuanto a la visualización de las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup>, cuando se realiza el implante de  $1 \times 10^6$  células a través de la vena caudal, no se conseguía obtener señales de bioluminiscencia para un tiempo de exposición de 5 min, más allá del lugar donde se produjo la inyección (Figura 61A).

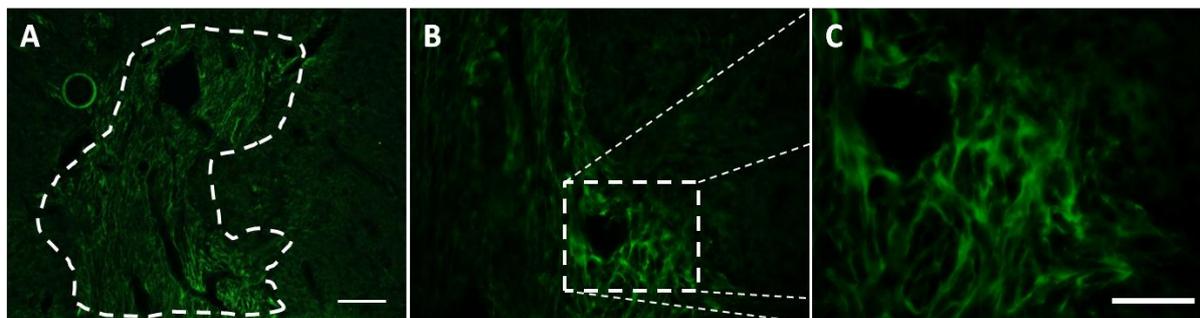
Cuando  $3 \times 10^5$  células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> se inyectaron en hígado, se tomaron imágenes en diferentes días, con un tiempo de exposición de 3 min. (Figura 62A). Los resultados obtenidos muestran que, al contrario de lo sucedido hasta ahora, la intensidad de la señal desde el día 1 hasta el día 3 aumenta de  $8,39 \times 10^7 \pm 0,26 \times 10^7$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr hasta  $16,12 \times 10^7 \pm 5,64 \times 10^7$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr. Sin embargo, entre el tercer día y el octavo la señal disminuye hasta los  $3,62 \times 10^7 \pm 1,29 \times 10^7$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr, un 77 % menos (Figura 62B). En la Figura 62A se aprecia como la señal entre el día 1 y el día 3 se va desplazando a lo largo del abdomen del animal. A partir del tercer día las células se localizan en un determinado lugar, hasta que ya, en el séptimo día, la señal disminuye permaneciendo las células en un lugar más localizado.



**Figura 62. Intensidad de bioluminiscencia de células inyectadas por vía i.h. A:** Imágenes tomadas con la cámara CCD tras el implante de  $3 \times 10^5$ , en diferentes días, con un tiempo de exposición de 3 min, tras inyección i.p. de D-Luciferina (3 mg/Kg). **B:** Intensidad de bioluminiscencia de distintas áreas. Se compara grupo basal y tratado usando la prueba t de Student \* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

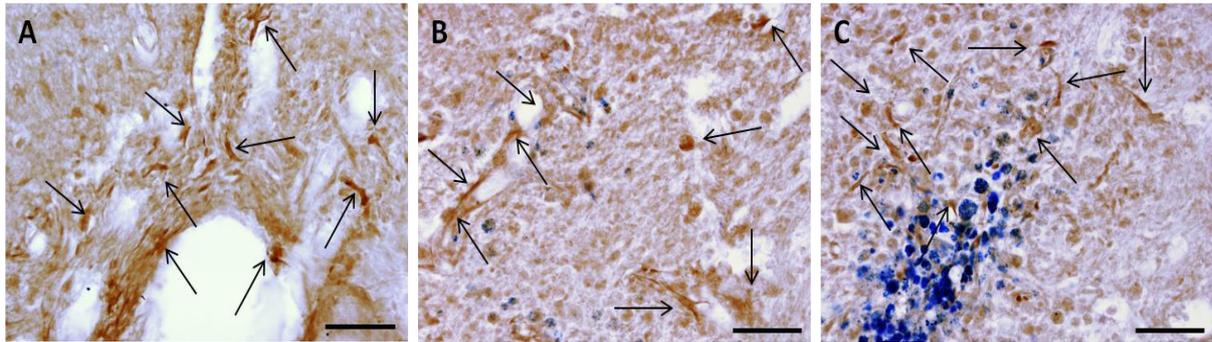
#### IV.6.4 Visualización de las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> en los diferentes implantes mediante técnicas inmunológicas

El hecho de que la señal luminosa se pierda no significa necesariamente que las células hayan muerto. Prueba de ello es que aún existen células positivas a luciferasa (Luc<sup>+</sup>), incluso hasta 6 meses después de haber sido implantadas (Figura 63). Esto sugiere que la cantidad de células que sobreviven y maduran no resultan suficientes para que puedan ser visualizadas mediante bioluminiscencia. También, existen evidencias de que los genes que se incorporan en el genoma mediante lentivirus pueden sufrir una disminución de su expresión cuando se producen fenómenos de migración o diferenciación (Vroemen *et al.*, 2005). Las imágenes mostradas en la Figura 63 ofrecen evidencia de que las células permanecen viables en el lugar 6 meses después de la implantación.



**Figura 63. Inmunofluorescencia de luciferasa (Luc) de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> tras 6 meses implantadas en SNC.** Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia usando un anticuerpo primario contra Luc y un secundario de fluoresceína (verde). **A:** Imagen tomada con un objetivo de 5x. El área punteada representa la zona del implante y la barra de escala es de 100 µm. **B:** Imagen tomada con el objetivo de 10x. **C:** Imagen tomada con el objetivo de 20x y la barra de escala es de 50 µm.

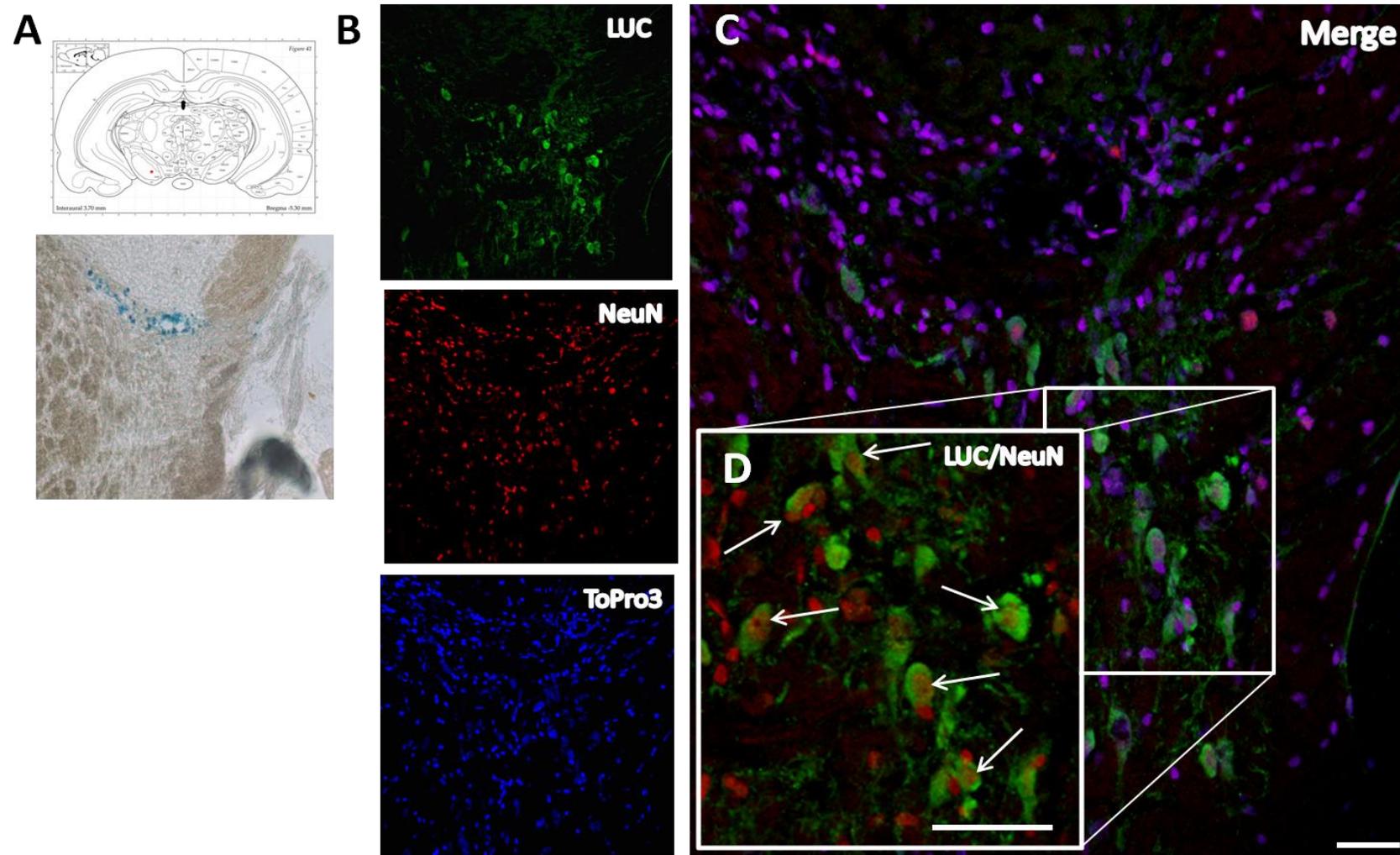
La fluorescencia verde determinada en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop40) no permite distinguir con claridad la morfología de las células, debido al ruido de fondo y la autofluorescencia propia del tejido. Sólo con aumentos de 40x conseguimos observar con algo de claridad la morfología celular (Figura 63C). Aun así, para obtener buenas imágenes y diferenciar las células del resto del tejido, hay que usar un microscopio confocal, como más adelante se verá. Otra manera de realizar el seguimiento de las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> y evitar problemas de autofluorescencia del tejido es mediante inmunohistoquímica. Se puede apreciar (Figura 64) mediante la indicación de flechas negras, cómo las células son positivas a Luc en los diferentes tejidos implantados: zona ventricular (Figura 64A), zona pretectal (Figura 64B) y sustancia nigra (Figura 64C), observándose con más claridad su morfología y distinguiéndose mejor del resto del tejido.



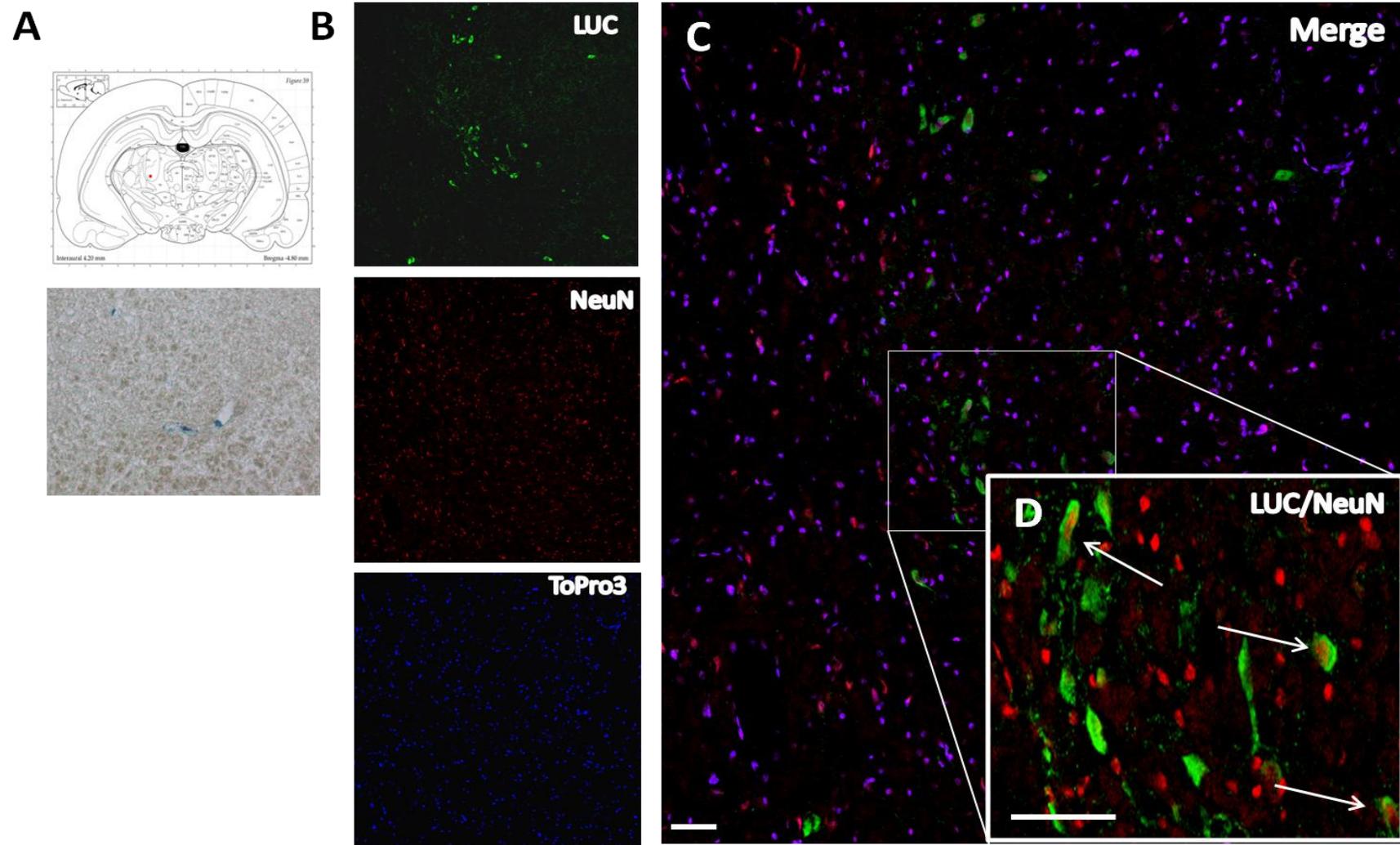
**Figura 64. Inmunohistoquímica de Luciferasa (Luc) de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en SNC.** Imágenes obtenidas en microscopio óptico, usando un anticuerpo primario contra Luc y revelado con DAB. **A:** Zona ventricular. **B:** Zona pretectal. **C:** Sustancia Nigra. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 10x. Las flechas negras indican células Luc<sup>+</sup>, y la barra de escala es de 50 μm.

Para realizar el seguimiento de las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup>, una vez que se haya perdido la señal bioluminiscente, también podemos aprovechar que las células transfectadas expresan luciferasa, para realizar inmunofluorescencia confocal y ver cómo influyen en el resto de células del entorno donde se han implantado. Así, mediante la utilización de un microscopio confocal (Zeiss LSM7 DUO) se realizaron inmunofluorescencias dobles de Luc y NeuN. Este último es un marcador específico de la proteína nuclear neuronal. La intención es comprobar si las células implantadas en SN (Figura 65A) podían detectarse mediante la determinación de Luc 6 meses después de la implantación y comprobar con NeuN si el tejido neuronal circundante se afectaba. En la Figura 65B podemos observar las tres inmunofluorescencias por separado, donde confirmamos que existen células Luc<sup>+</sup> (verde), completamente rodeadas de células NeuN (rojo). El marcador ToPro3 (azul) proporciona la información de que se tratan de células y no de agregados celulares.

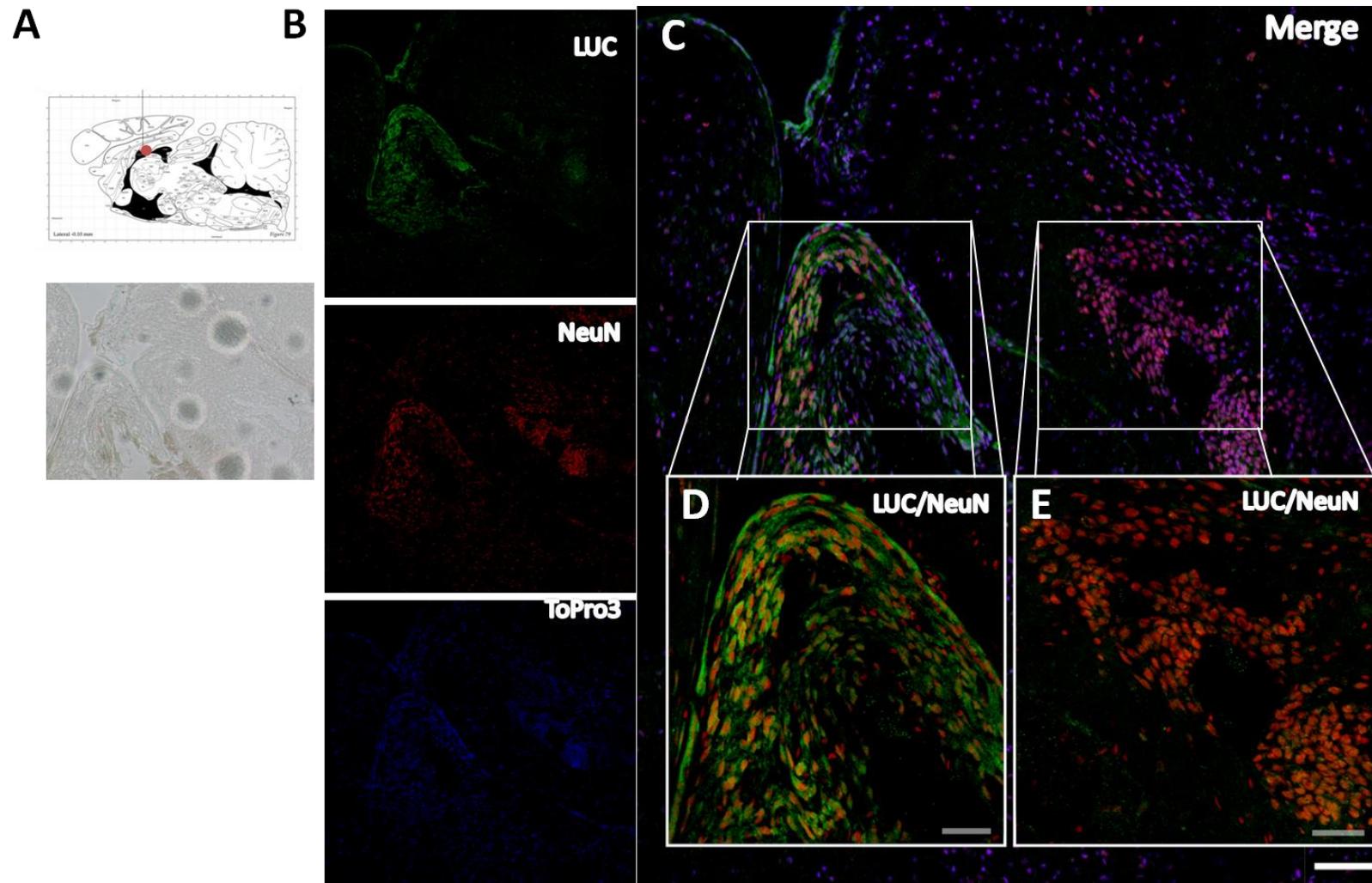
Cuando fusionamos las imágenes (Figura 65C) observamos que células que expresan Luc<sup>+</sup> contienen núcleos NeuN<sup>+</sup> (rojo) en SN. Si eliminamos el marcador ToPro3 de núcleos, y ampliamos la imagen, podemos observar, como indican las flechas blancas en la Figura 65D, algunos ejemplos. Hemos de mencionar que la intensidad de NeuN en las células Luc<sup>+</sup> no es más fuerte que en el resto de células NeuN<sup>+</sup>, y que existen también algunas células Luc<sup>+</sup> que no expresan NeuN.



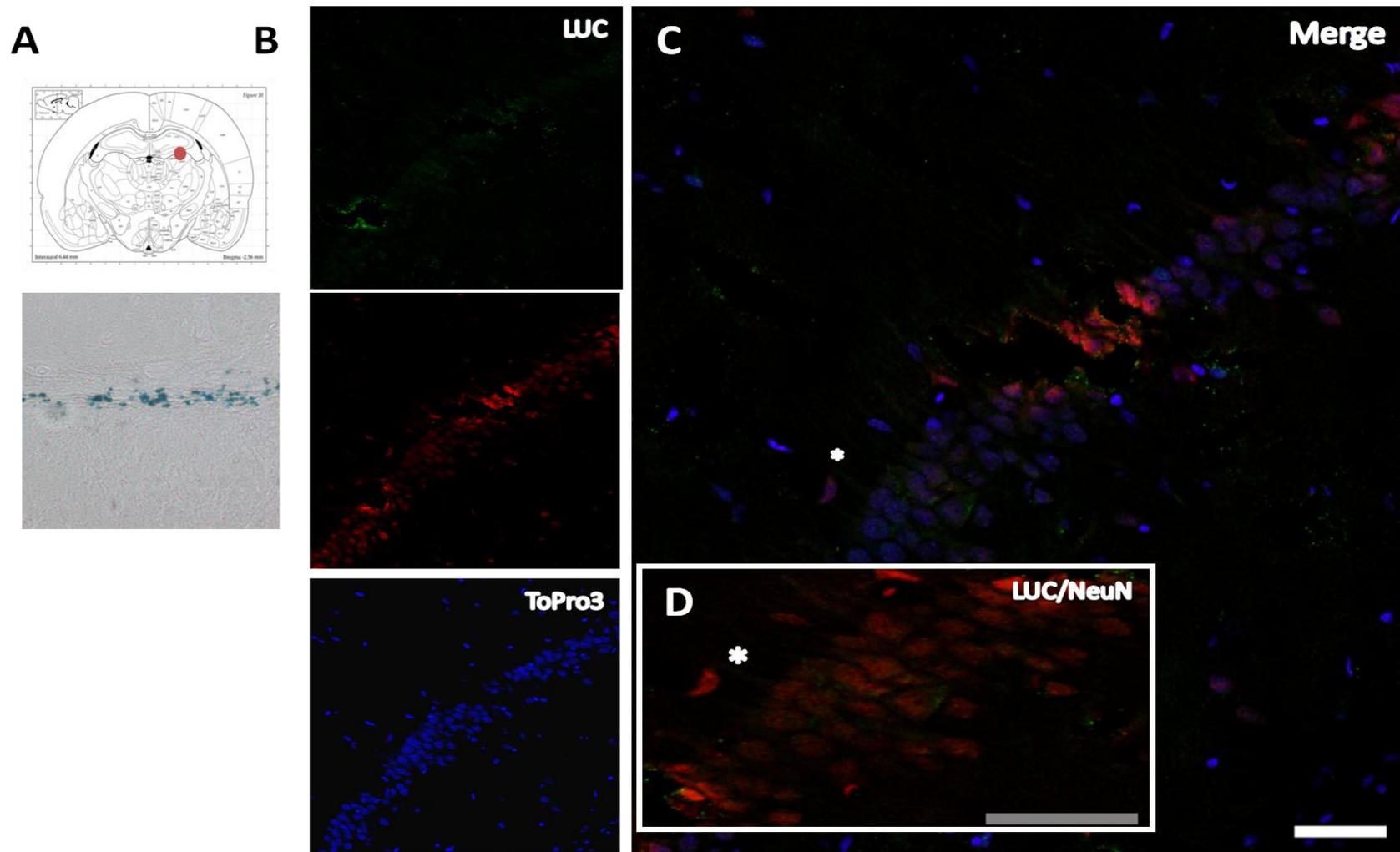
**Figura 65. Inmunofluorescencia confocal de Luc, NeuN y ToPro3 de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en SN.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal, usando anticuerpos primarios contra Luc y NeuN y secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado ToPro3 (azul). **A:** Zona donde se ha realizado el implante con la confirmación de Monastral Blue en la zona de inyección. **B:** Imágenes por separado. **C:** Unión de todas las imágenes en un mismo plano. **D:** Región de interés donde solo representamos Luc y NeuN. Las flechas blancas indican presencia de NeuN en células Luc<sup>+</sup>. La barra de escala es de 50  $\mu$ m.



**Figura 66. Inmunofluorescencia confocal de Luc, NeuN y ToPro3 de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en el área Pretectal.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal, usando anticuerpos primarios contra Luc y NeuN y secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado ToPro3 (azul). **A:** Zona donde se ha realizado el implante con la confirmación de Monastral Blue en la zona de inyección. **B:** Imágenes por separado. **C:** Unión de todas las imágenes en un mismo plano. **D:** Región de interés donde solo representamos Luc y NeuN. Las flechas blancas indican presencia de NeuN en células Luc<sup>+</sup>. La barra de escala es de 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 67. Inmunofluorescencia confocal de Luc, NeuN y ToPro3 de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en el área Ventricular.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal, usando anticuerpos primarios contra Luc y NeuN con secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado ToPro3 (azul). **A:** Zona donde se ha realizado el implante con la confirmación de Monastral Blue en la zona de inyección. **B:** Imágenes por separado. **C:** Unión de todas las imágenes en un mismo plano. **D y E:** Región de interés donde solo representamos Luc y NeuN. La barra de escala es de 200  $\mu\text{m}$  en C y de 50  $\mu\text{m}$  en D y E.



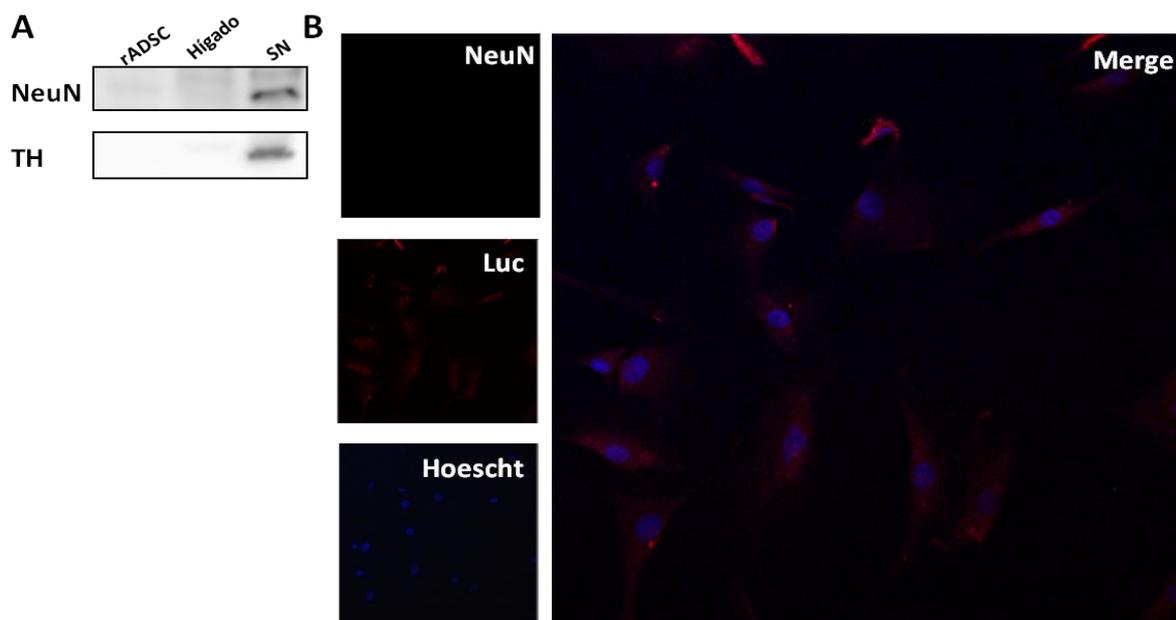
**Figura 68. Inmunofluorescencia confocal de Luc, NeuN y ToPro3 de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en HP.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal, usando anticuerpos primarios contra Luc y NeuN con secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado ToPro3 (azul). **A:** Zona donde se ha realizado el implante con la confirmación de Monastral Blue en la zona de inyección. **B:** Imágenes por separado. **C:** Unión de todas las imágenes en un mismo plano. **D:** Región de interés donde solo representamos Luc y NeuN. La barra de escala es de 50  $\mu$ m.

Si realizamos la determinación en la zona pretectal (Figura 66A), volvemos a obtener resultados similares. Observamos cómo en la zona donde se ha realizado el implante (indicado por la presencia del azul de Monastral Blue) existen células Luc<sup>+</sup> (verde), rodeadas por células NeuN<sup>+</sup> (rojo) y ToPro3 (azul), que identifica los núcleos celulares (Figura 66B). Sin embargo, cuando fusionamos las imágenes (Figura 66C), se vuelven a observar células Luc<sup>+</sup> que contienen núcleos NeuN<sup>+</sup> (rojo), también con menor intensidad que el resto de células NeuN<sup>+</sup>, y no todas las células Luc<sup>+</sup> expresan NeuN, como se puede observar con más detalle en la Figura 66D.

Otra zona anatómica donde se realizó el implante de células rADSCs-GFP- Luc<sup>+</sup>, y en mayor número, fue en el ventrículo cerebral lateral derecho (Figura 67A). Es en esta zona donde observamos una mayor cantidad de células Luc<sup>+</sup> (Figura 67B). Desconocemos si esas células se han instalado en esa zona tras viajar a través de los ventrículos, o si el implante se ha realizado con precisión concreta en dicha zona. Existen dudas, puesto que en la zona donde se ha medido la inmunofluorescencia no se apreciaba con claridad la presencia de Monastral Blue (Figura 67A). Volvemos a observar células Luc<sup>+</sup> (verde), células NeuN<sup>+</sup> (rojo) y ToPro3 (azul) (Figura 67B). Cuando fusionamos las imágenes (Figura 67C), se vuelven a observar células Luc<sup>+</sup> con núcleos NeuN<sup>+</sup> (rojo). En esta ocasión hemos seleccionado dos zonas: una donde se aprecian células Luc<sup>+</sup> con núcleos NeuN<sup>+</sup> (Figura 67D), y otra en la que existe un gran número de células, pero se trata sólo de NeuN<sup>+</sup> (Figura 67E). Esto demuestra que la co-localización de Luc<sup>+</sup> y NeuN<sup>+</sup> no se debe a la autofluorescencia del tejido, a pesar de llevar a cabo las determinaciones en un microscopio confocal.

En hipocampo (HP) (Figura 68A) obtenemos resultados completamente distintos. En la zona donde se ha realizado el implante se observa la fuerte presencia de Monastral Blue (Figura 68A), pero no existen células Luc<sup>+</sup> (verde). Hay una completa ausencia de color verde (Figura 68B), pero sí de células NeuN<sup>+</sup> (rojo) y que presentan ToPro3 (núcleos celulares). Al fusionar las imágenes, observamos que el color predominante es el rojo de NeuN<sup>+</sup> (Figura 68C), y aunque ampliemos la imagen sigue sin observarse la presencia de células Luc<sup>+</sup> (verde) (Figura 68D).

Otra circunstancia a tener en cuenta es que cuando se determina mediante inmunofluorescencia y WB estos marcadores en rADSCs antes de ser implantadas parece que *per se* no los expresan (Figura 69), por lo que la posible diferenciación de rADSCs a neurinas se tendría que inducir a través de la estimulación del entorno donde se implantan.

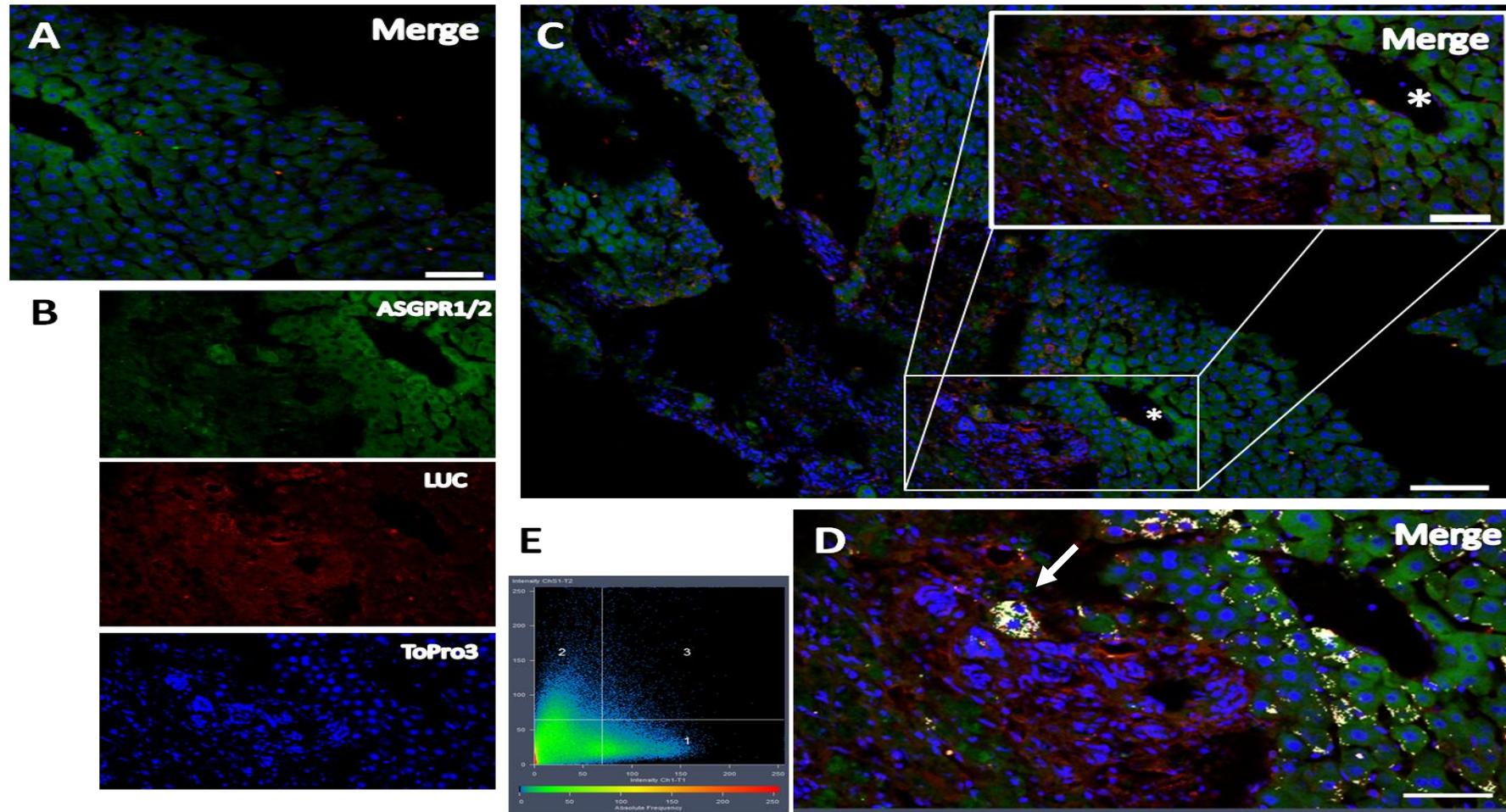


**Figura 69. Presencia de NeuN y TH en rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> antes de ser implantadas.** **A:** WB de las proteínas NeuN y TH de muestras obtenidas de células madre rADSC, Hígado y SN. **B.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal usando anticuerpos primarios contra NeuN y Luc y secundarios de Alexa Fluor 647 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado Hoescht (azul).

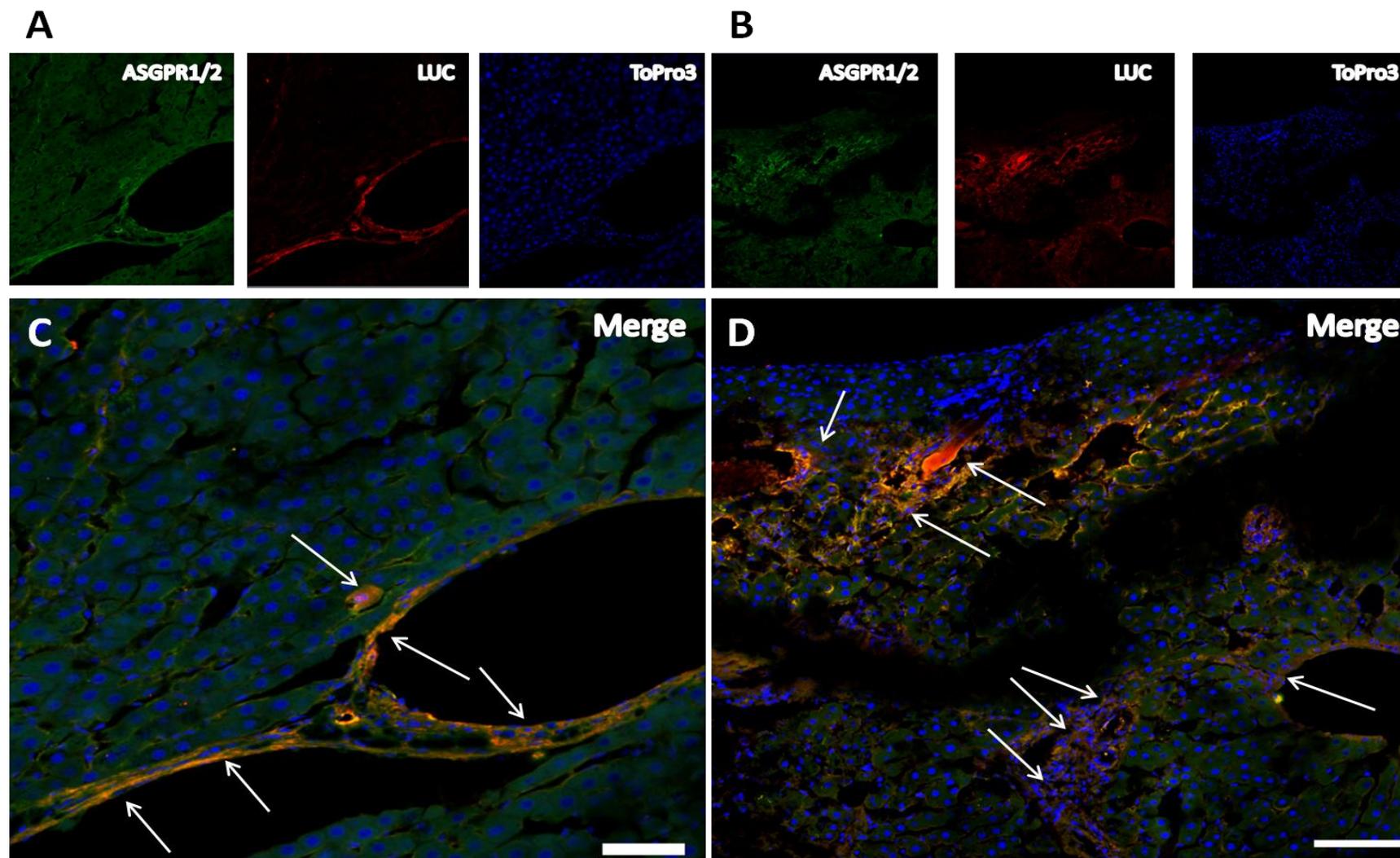
Cuando llevamos a cabo la inmunofluorescencia de las células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en tejido hepático utilizamos el anticuerpo específico para células hepáticas (ASGPR1/2) y determinamos su co-localización con Luc<sup>+</sup> mediante microscopía confocal. Si bien es cierto que para demostrar la diferenciación hasta hepatocitos de las MSCs se han empleado técnicas inmunológicas ó PCR, usando otras proteínas como albumina,  $\alpha$ -fetoproteína y citoqueratina-19 (Sato *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2015), también se ha usado ASGPR1/2 como indicador de diferenciación de células madre hasta hepatocitos (Sato *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2012). Ya que el empleo de albúmina, o cualquier otra proteína presente en los fluidos extracelulares, podía implicar una severa señal de ruido, se decidió usar una proteína receptora de membrana, específica de hepatocitos. Al realizar el análisis de co-localización en una zona donde no hay evidencias de haber inyectado rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> (ausencia de Monastral Blue), observamos que las células presentes en la imagen sólo expresan ASGPR1/2 (verde), existiendo una total ausencia de Luc<sup>+</sup> (rojo) y sólo la tinción de los núcleos mediante ToPro3 (Figura 70A). Pero al desplazarnos hacia una zona donde existen evidencias de haberse realizado el implante, observamos cómo existen células ASGPR1/2<sup>+</sup> (verde) con morfología característica de hepatocitos y células Luc<sup>+</sup> (rojo) con una morfología menos definida (Figura 70B). Al fusionar las imágenes, se puede observar cómo

existen áreas de hepatocitos (verde) agrupados alrededor del centrolobulillar y otra zona donde existe un hacinamiento (núcleos ToPro<sup>+</sup>) de células Luc<sup>+</sup> (Figura 70C). Ampliando esta última zona, observamos que aparece algo de co-localización entre ASGPR1/2 y Luc, pero sólo en aquellas células que tienen morfología de hepatocitos (Figura 70D). Esto parece indicar que es necesario presentar esa morfología para expresar ASGPR1/2, aunque bien es cierto que la co-localización no es muy evidente, como se deduce de la baja densidad de la banda diagonal de colocación en el fluorograma (Figura 70E).

Al analizar otras zonas anatómicas donde se han implantado las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup>, contemplamos que los resultados tienen una tendencia similar, existiendo zonas donde hay células ASGPR1/2<sup>+</sup> (verde), con morfología característica de hepatocitos, y células Luc<sup>+</sup> (rojo), con una morfología menos definida (Figuras 71A y B). En esta ocasión, las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> no sólo co-localizan ASGPR1/2 y Luc en aquellas células con morfología de hepatocitos, sino que también presentan ASGPR1/2 aquellas células Luc<sup>+</sup> que se encuentran en zonas en torno a los centros centrolobulillares, como indican las flechas blancas en las Figuras 71C y D, y cuya morfología es más parecida a las células endoteliales que recubren los sinusoides.



**Figura 70. Inmunofluorescencia confocal de ASGPR1/2, Luc y ToPro3 de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en hígado mediante inyección i.h.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal usando anticuerpos primarios contra ASGPR1/2 y Luc y secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado ToPro3 (azul). **A:** Zona ajena donde no hay presencia de Monastral Blue. **B:** Imágenes por separado. **C:** Unión de todos los colores en un mismo plano. **D:** Región de interés donde realizamos la co-localización de ASGPR1/2 y Luc. **E:** Fluorograma como confirmación de co-localización. La barra de escala es de 200  $\mu\text{m}$  en C, y de 50  $\mu\text{m}$  en A y D.



**Figura 71. Inmunofluorescencia confocal de ASGPR1/2, Luc y ToPro3 de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en hígado mediante inyección i.h.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal usando anticuerpos primarios contra ASGPR1/2 y Luc y secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado ToPro3 (azul). **A** y **B**: Imágenes por separado de dos zonas diferentes. **C** y **D**: Unión de todas las imágenes en un mismo plano donde indicamos la co-localización de ASGPR1/2 y Luc mediante flechas blancas. La barra de escala es de 50  $\mu$ m en C; y de 200  $\mu$ m en D.

## IV.7 USO POTENCIAL DE LAS CELULAS rADSC COMO TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los resultados mostrados previamente han estado relacionados con las capacidades de las rADSCs para resistir al estrés oxidativo, diferenciación, supervivencia, y otras propiedades que las posicionan como candidatas para llevar a cabo una terapia celular, incluso en el SNC, ya que hemos visto en los resultados anteriormente descritos que pueden presentar fenotipo neuronal expresando la proteína NeuN. Pero esto último no es el único aspecto que convierte a las rADSCs en candidatas para tratar enfermedades degenerativas. Otro hecho importante es su carácter inmunomodulador. Parece evidente que las MSCs pueden tanto estimular el sistema inmune, como provocar la inmunosupresión (Yagi *et al.*, 2010; English and Mahon; 2011, Dazzi *et al.*, 2012). Hay incluso quien sostiene que se trata de células inmunoprivilegiadas porque su presencia no origina reacción antigénica por parte del sistema inmunitario, convirtiéndolas en aptas para trasplantes (Yagi *et al.*, 2010). Sin embargo, existen evidencias de que no son tan privilegiadas como parecen, y pueden provocar una respuesta inmunitaria que puede dar lugar a una menor supervivencia de las MSCs trasplantadas (Eliopoulos *et al.*, 2005; Coyne *et al.*, 2006), aunque se sugiere que podría deberse a alteraciones sufridas por las técnicas de cultivo y manipulaciones posteriores *in vitro* (Eggenhofer *et al.*, 2014; Levin *et al.*, 2014). Si se considera más detenidamente, las MSCs son células madre que permiten, en su mayoría, descendencia de células del tejido conectivo, tejido que está en primera línea cuando se produce un daño por agentes externos al organismo. Si se trata de microorganismos, lo que interesa es que la respuesta inmune sea estimulada, por lo tanto cuando existe presencia de PAMPs o activación de los receptores TLR3 y TLR4, las MSCs promueven la estimulación del sistema inmune (Liotta *et al.*, 2008; English and Mahon, 2011; Thakur *et al.*, 2013; Ulrich *et al.*, 2015). Cuando el agente externo causante del daño haya sido, en mayor o menor medida eliminado, lo que se pretende es que haya una regeneración del tejido dañado, a la vez que exista una inactivación del sistema inmune para evitar una situación crónica del daño.

Hay estudios que demuestran que las MSCs en ausencia de PAMPs (English and Mahon, 2011), o en presencia de citoquinas como IFN $\gamma$  ó TNF $\alpha$ , ocasionan inmunosupresión en linfocitos T, células NK, células DC, y otras, liberando, incluso, citoquinas como PGE, TGF (Yagi *et al.*, 2010; Dazzi *et al.*, 2012), galectina-1, SDF-1 $\alpha$  y TSG6, que han demostrado presentar un efecto inhibitor sobre la microglía (Gieseke *et al.*, 2010; Starossom *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). Todos estos hechos acumulados son los que propiciaron estimar un posible

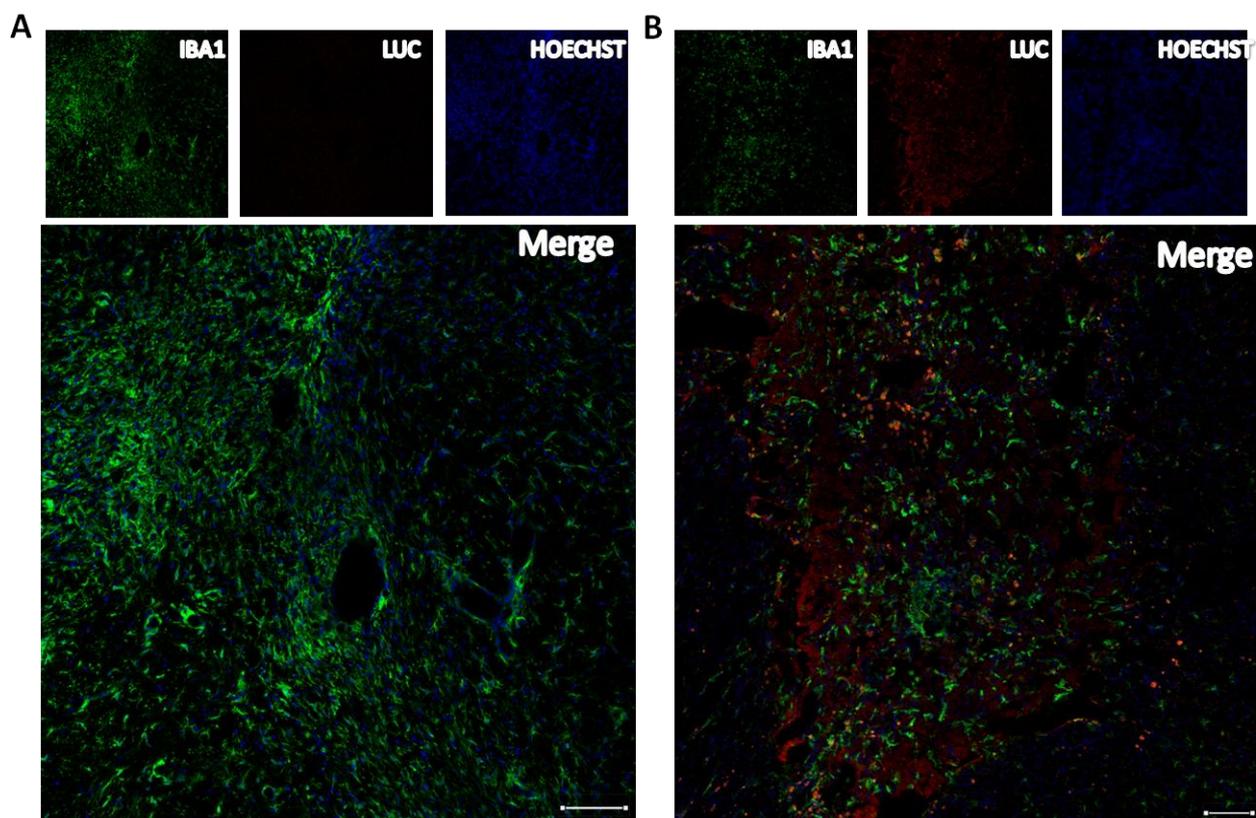
uso de las rADSCs como tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Aunque varios autores lo han intentado con diversas estrategias, los resultados obtenidos han sido divergentes, pues hay quien ha conseguido una neuroprotección *in vivo* o *in vitro* (Wang *et al.*, 2010a; Stemberger *et al.*, 2011; Ooi *et al.*, 2015) y quien, por el contrario, no ha obtenido neuroprotección (Camp *et al.*, 2009; Schwerk *et al.*, 2015). Dejando aparte las conjeturas sobre la respuesta inmune, parecen existir otros factores que influyen en una neuroprotección eficaz (Levin *et al.*, 2014).

#### **IV.7.1 Efecto de las rADSCs implantadas en sustancia nigra (SN) de ratas tratadas con LPS**

Para estudiar este efecto implantamos  $5 \times 10^4$  células rADSCs en SN mezcladas con 8  $\mu\text{g}$  de LPS. El objetivo es observar el efecto de las rADSCs ante la activación microglial por LPS y posterior neurodegeneración dopaminérgica (Machado *et al.*, 2011). Para ello, usamos las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> y esperamos un tiempo de 4-6 meses para ver el resultado después de que hayan pasado los procesos de daño, inflamación, degeneración, supervivencia y maduración del implante (Coyne *et al.*, 2006).

Lo que evidencian los primeros resultados obtenidos es que la microglía sigue activada en gran medida tras 4-6 meses después del implante, aunque con una presencia más evidente cuando sólo se inyecta LPS (Figura 72A). Observamos que la imagen se encuentra completamente inundada de células Iba1<sup>+</sup>. No podríamos definir con claridad cuáles se encuentran activadas (morfología circular) o inactivadas (morfología estrellada), pero sin duda la proliferación de la microglía es evidente. Cuando observamos la zona en la que se implantan las rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> junto con LPS, parece que el número de células Iba1<sup>+</sup> (verde) es mucho menor (Figura 72B). Para poder confirmarlo se requiere de un análisis estereológico de la zona, que se muestra más adelante. Lo que sí se observa en esta imagen es una gran mancha roja de células Luc<sup>+</sup> que, además, presentan núcleos (Hoechst), por lo que se puede afirmar que se trata de células madre que han sobrevivido al implante y que han madurado después de 4-6 meses. Otro resultado importante es la aparición de co-localización entre los anticuerpos utilizados (naranja), que observamos mejor en la Figura 73, donde analizamos otra zona en la que se realizó el implante de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> junto con 8  $\mu\text{g}$  de LPS, y volvemos a observar células Iba1<sup>+</sup> (verde), sin distinciones entre activadas e inactivadas, células Luc<sup>+</sup> (rojo) y núcleos marcados con Hoechst (azul) (Figura 73A). Cuando fusionamos las imágenes (Figura 73B), se aprecian algunas células Luc<sup>+</sup> con Iba1<sup>+</sup> (tonalidad

naranja). Para que no haya lugar a dudas de que se trate de un efecto visual realizamos a la imagen un análisis de co-localización (Figura 73C), observándose de color blanco aquellos sitios donde Luc e Iba1 se colocan. Además, el fluorograma (Figura 73D) demuestra que no se trata de ningún artificio técnico.



Lo que no conseguimos demostrar con la imágenes es si la co-localización se debe a

**Figura 72. Inmunofluorescencia confocal de Iba1, Luc y Hoechst de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en SN junto con 8 µg de LPS.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal, usando anticuerpos primarios contra Iba1 y Luc y secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado Hoechst (azul). **A:** Imágenes, por separado y unidas, de una región pinchada con LPS. **B:** Zona donde se ha inyectado LPS junto con rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup>. La barra de escala es de de 200 µm.

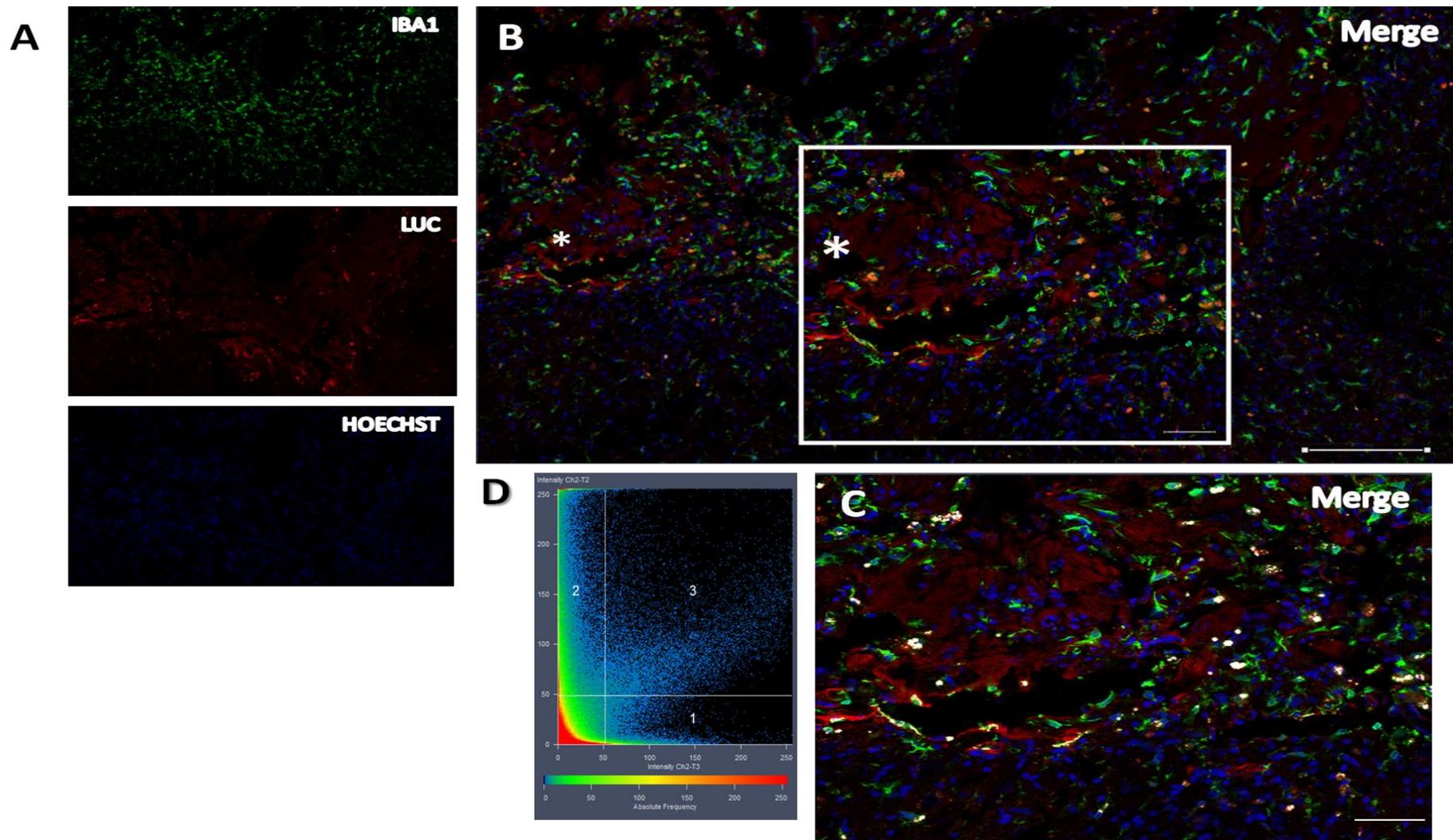
una diferenciación de las rADSCs en células con fenotipo macrófago o microglial o si se trata de microglía que haya podido degradar parte de las células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> y haya podido ser la causa de esa co-localización. Descartamos que pudiera existir una expresión intrínseca de Iba1 por parte de las rADSCs, debido a que existen muchas células solamente Luc<sup>+</sup>.

Después de haber comprobado que la microglía sigue presente tras 4-6 meses desde la implantación, pero con una presencia menor cuando se inyecta LPS y rADSCs, vimos qué ocurre con las neuronas dopaminérgicas cuando inyectamos 8 µg de LPS junto a  $5 \times 10^4$

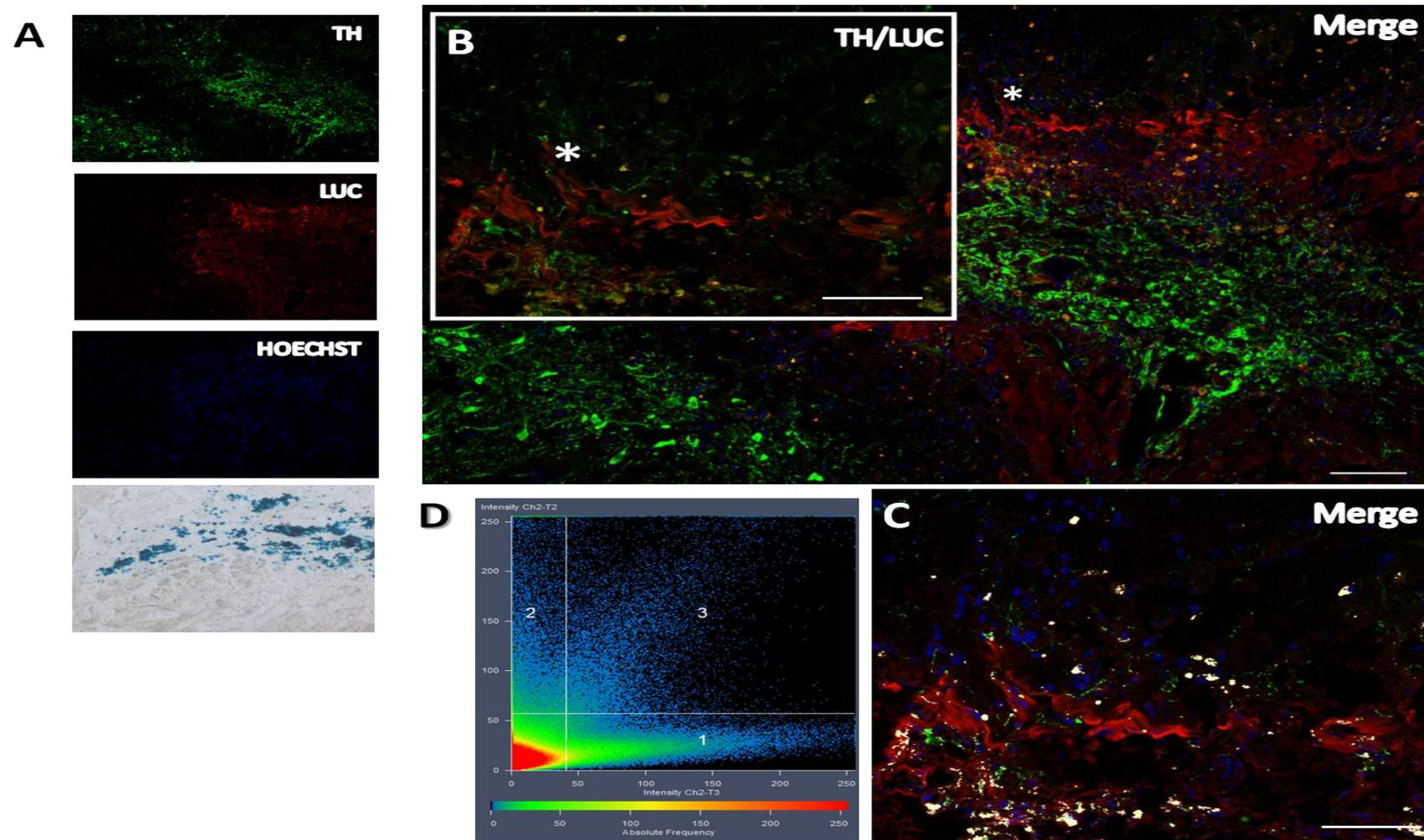
---

células rADSCs, pues están ampliamente descritos los efectos del LPS en SN sobre neuronas dopaminérgicas (Burguillos *et al.*, 2011b; Machado *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos (Figura 74) son menos esperados, y sorprendentes. El implante de rADSCs, si bien no ha sido directamente en SN, ha quedado un poco en una posición más dorsal con respecto a SN; este hecho no impide que el LPS pueda ejercer su acción. Podemos observar una zona TH<sup>+</sup> (verde) con cuerpos celulares definidos, característicos de neuronas dopaminérgicas, en su lugar habitual en SN, y otra zona TH<sup>+</sup> (verde) en el lugar donde se ha producido el implante de rADSCs (Figura 74B), que se reconoce por la presencia Monastal Blue y por tener mayor cantidad de células Luc<sup>+</sup> (rojo) (Figura 74A). Podríamos ir más allá confirmando que existe una co-localización en algunas células entre TH y Luc. En esta ocasión, a diferencia de la co-localización de Iba1 y Luc, se trataría de cuerpos celulares, pues algunas de las células que presentan co-localización de ambas proteínas presentan núcleo, visible con Hoechst (Figura 74C). La co-localización se confirma con el fluorograma correspondiente (Figura 74D).

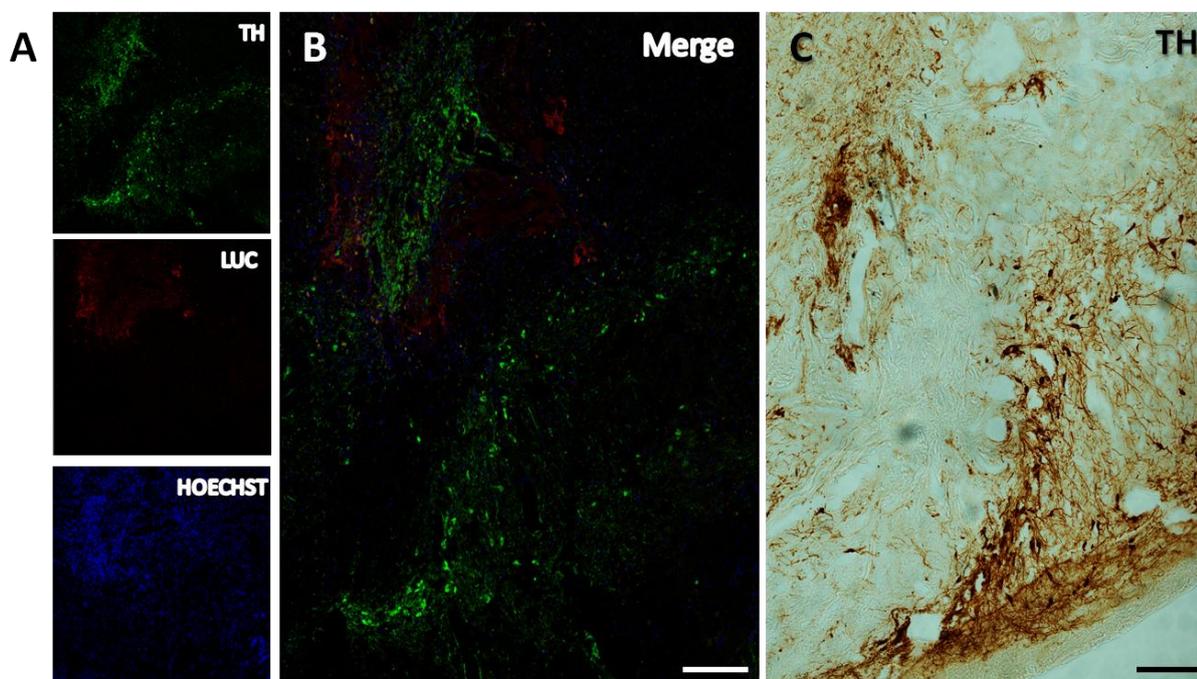


**Figura 73. Inmunofluorescencia confocal de Iba1, Luc y Hoechst de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en SN junto con 8  $\mu$ g de LPS.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal, usando anticuerpos primarios contra Iba1 y Luc y secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado Hoechst (azul). **A:** Imágenes por separado. **B:** Unión de todos los colores en un mismo plano. (\*) indica la zona ampliada en el recuadro adjunto a la imagen. **C:** Región de interés (\*) donde realizamos la co-localización de Iba1 y Luc. **D:** fluorograma de confirmación co-localización. La barra de escala es de 200  $\mu$ m.



**Figura 74. Inmunofluorescencia confocal de TH, Luc y Hoechst de células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup> implantadas en SN junto con 8 µg de LPS.** Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal, usando anticuerpos primarios contra TH y Luc y secundarios de Alexa Fluor 488 (verde) y Texas Red (rojo), respectivamente. Como marcador de núcleos se ha usado Hoechst (azul). **A:** Imágenes por separado incluida la región con presencia de Monastral Blue. **B:** Unión de todos los colores en un mismo plano. (\*) indica la zona ampliada en el recuadro adjunto en la imagen donde solo visualizamos TH y Luc. **C:** Región de interés (\*) donde realizamos la co-localización de TH y Luc. **D:** Fluorograma como confirmación de co-localización. La barra de escala es de 200 µm.

No podemos afirmar con certeza si la co-localización se debe a una diferenciación de las rADSCs en células con fenotipo dopaminérgico, lo cual es sugerido por algunos autores (Trzaska and Rameshwar, 2011; Wang *et al.*, 2013), o bien si se debe a fenómenos de fusión entre una célula ADSCs y otra TH<sup>+</sup>, fenómeno que puede ocurrir con MSCs y otros tipos celulares (Ferrand *et al.*, 2011; Kemp *et al.*, 2011). Queda por resolver aún cómo células TH<sup>+</sup> migran hasta una zona alejada de la SN, incluso completamente rodeadas por células Luc<sup>+</sup>. Para descartar la posibilidad de que la presencia de fucsina fuese la causante de esa coloración verde, y por tanto una falsa positividad a TH, se realizó una inmunohistoquímica de TH en la misma zona (Figura 75). Se representa, por un lado, las imágenes de la inmunofluorescencia, donde se aprecian las células TH<sup>+</sup> y Luc<sup>+</sup> (Figura 75A) con su respectiva imagen fusionada (Figura 75B) y, por otro lado, una imagen donde se ha realizado una inmunohistoquímica para TH (Figura 75C). Con esto se muestra que la señal verde ocasionada en el lugar del implante no está producida por la autofluorescencia provocada por fucsina, pues no habría aparecido reactividad a TH en la zona del implante mediante la inmunohistoquímica, y esta es bastante notable. Se despejan, así, las dudas de que pudiera tratarse de un efecto trófico por parte de los axones que habrían viajado hacia dicha zona desde las neuronas dopaminérgicas de la SN colindantes.

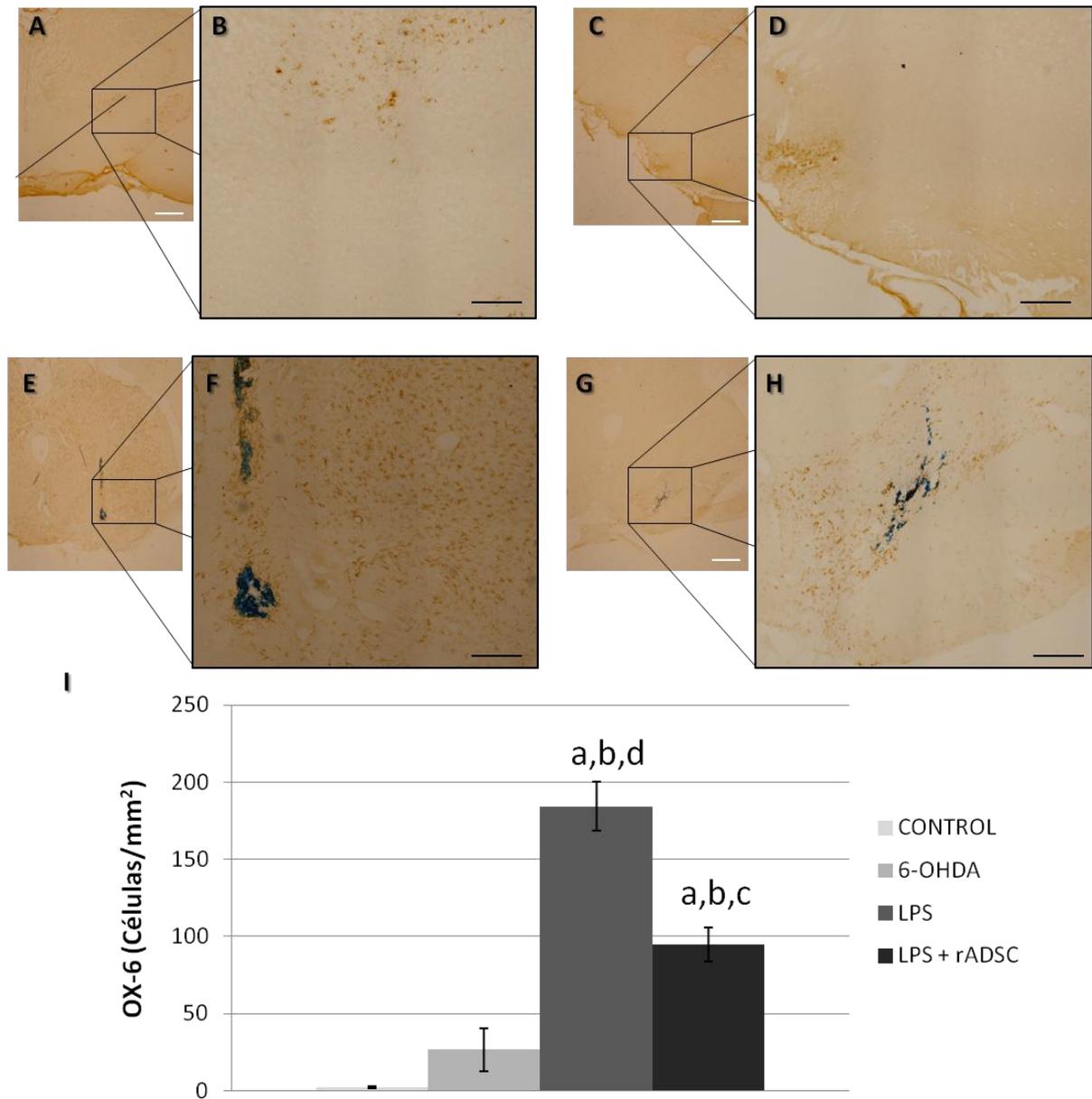


**Figura 75. Demostración de la presencia de TH en la zona del implante.** A y B: Se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopio confocal usando anticuerpos primarios contra TH y Luc de manera separada, y fusionando las imágenes, respectivamente. C: Imagen de la misma muestra, a la que se le ha realizado una inmunohistoquímica para TH mediante tinción con DAB. La barra de escala es de 500  $\mu\text{m}$ .

#### IV.7.2 Determinación de la activación microglial tras terapia celular con rADSCs mediante análisis estereológico de OX-6

Para ver si los resultados puntuales obtenidos anteriormente son estadísticamente significativos se llevó a cabo un experimento descrito en el apartado de la Parte Experimental III.3.5. que consiste en tratar bilateralmente 4 grupos de animales: grupo control, grupo tratado con 8  $\mu\text{g}$  de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), grupo tratado con 8  $\mu\text{g}$  de LPS y grupo tratado con 8  $\mu\text{g}$  de LPS más  $5 \times 10^4$  de células rADSCs. En esta ocasión, no se han utilizado células rADSCs-GFP-Luc<sup>+</sup>, y aquellos animales que no manifestaban Monastral Blue en la zona correcta fueron descartados. Como muestran las imágenes de la Figura 76, apenas existe activación microglial en el grupo control 4 meses después del tratamiento (Figuras 76A y B). Incluso, en el grupo de las tratadas con 6-OHDA se puede apreciar que la activación es muy baja (Figuras 76C y D). Estos resultados ya eran esperados (Espinosa-Oliva *et al.*, 2014) y su inclusión en este experimento confirma que el mecanismo de degeneración dopaminérgica con 6-OHDA con respecto al del tratamiento con LPS es distinto, como podemos observar en las imágenes de la Figura 76, correspondientes al grupo tratado con LPS, en la que aparece una activación microglial notable. En cambio, esa activación no es tan intensa en los animales tratados con rADSCs (Figuras 76G y H), lo que se corresponde con lo anteriormente observado en la Figura 72.

Tras el análisis estereológico (Figura 76I), se observó que existe una pequeña activación microglial en el grupo tratado con 6-OHDA, respecto al control. Aunque el mecanismo de degeneración dopaminérgica de la 6-OHDA no sea por inflamación, se provoca una mínima activación de la microglía (Espinosa-Oliva *et al.*, 2014). Sin embargo, esta activación no es comparable con la que se produce en los animales tratados con LPS, donde los niveles de células OX-6 positivas son  $184,2 \pm 15,9 / \text{mm}^2$ , comparados con los de 6-OHDA que son  $26,6 \pm 14,1 / \text{mm}^2$ . En el grupo de LPS tratado con rADSCs se consigue disminuir los niveles de células OX-6 hasta  $94,9 \pm 10,9 / \text{mm}^2$ , un 48,4% menos de activación microglial. Se demuestra, así, que las células rADSCs disminuyen la activación microglial, después de 4 meses tras el implante.



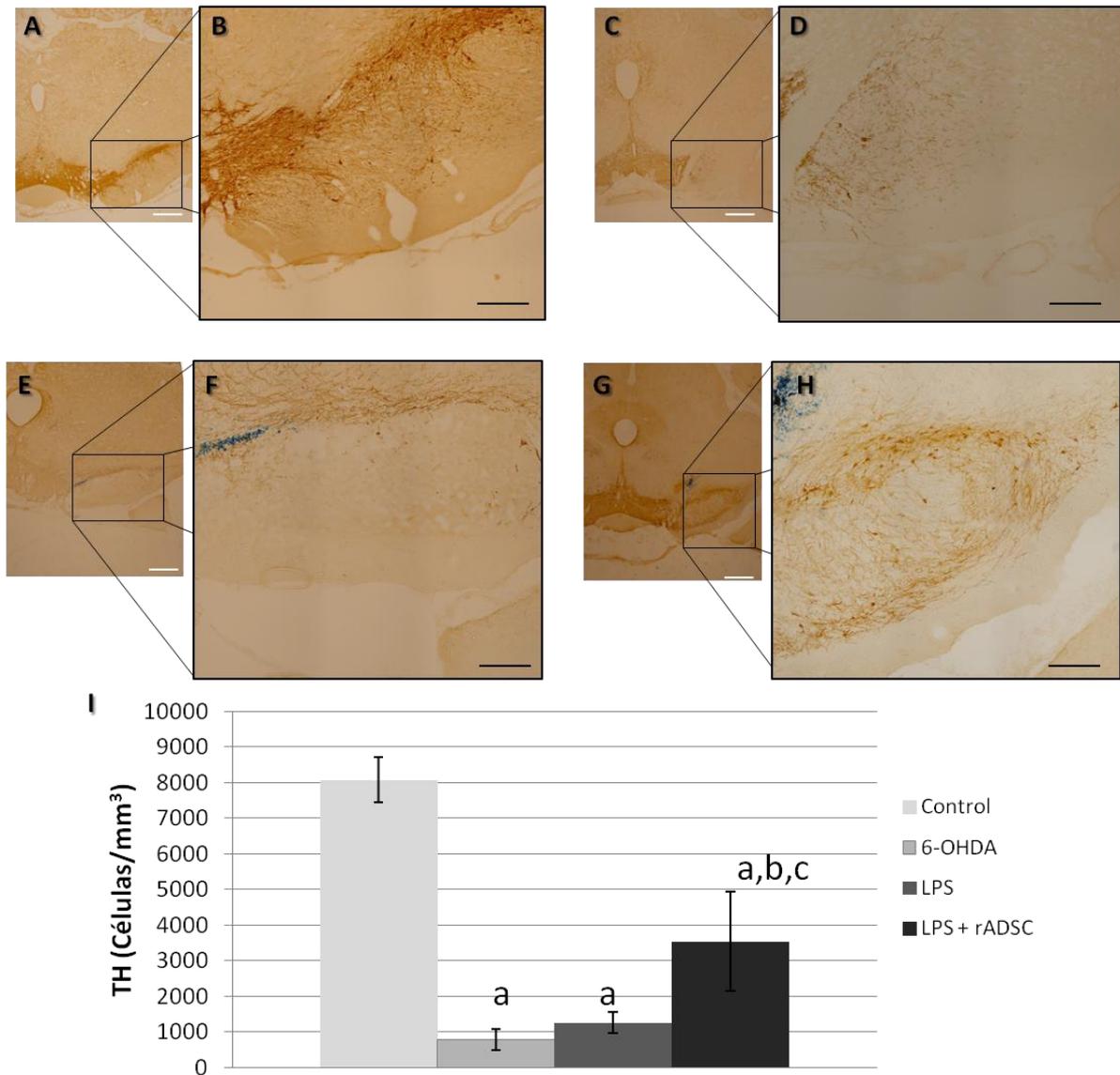
**Figura 76. Determinación de la activación microglial.** A-H: Imágenes obtenidas en microscopio óptico tras la realización de una inmunohistoquímica para OX-6 revelada con DAB. Las imágenes A y B corresponden al grupo control, C y D corresponden al grupo de 6-OHDA, E y F corresponden al grupo LPS, y G y H corresponden al grupo LPS + rADSC. La barra de escala de color blanca es de 500  $\mu\text{m}$ , y la de color negro es de 200  $\mu\text{m}$ . I: Diagramas de barras que representan el n° de células /mm<sup>2</sup>  $\pm$  desviación estándar, frente a cada grupo de animales. <sup>a</sup>Significativo (N=4, p=0,0001) respecto al grupo Control. <sup>b</sup>Significativo (N=3, p=0,0001) respecto al grupo 6-OHDA. <sup>c</sup>Significativo (N=4, p=0,0001) respecto al grupo LPS. <sup>d</sup>Significativo (N=4, p=0,0001) respecto al grupo LPS + rADSC.

### IV.7.3 Cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas tras terapia celular con rADSCs mediante análisis estereológico de TH

Para demostrar que el efecto en la disminución de la activación microglial puede producir un efecto neuroprotector se realizó un recuento de neuronas TH<sup>+</sup> de la SN, mediante estereología en las distintas condiciones. Como muestran las imágenes (Figura 77), el grupo control mantiene prácticamente íntegra su SN, 4 meses después del tratamiento (Figuras 77A y B), contrariamente a lo que ocurre con el grupo de 6-OHDA, donde se ha producido casi una completa eliminación de la SN (Figuras 77C y D). En las imágenes de las Figuras 77E y F, correspondientes al grupo tratado con LPS, se aprecia visualmente que la SN no ha sido destruida completamente, aunque sólo se consiga ver la presencia de axones, y no de cuerpos celulares. En cuanto a los animales tratados con rADSCs, aunque haya disminuido también considerablemente la SN, se puede observar la presencia de algunos cuerpos celulares (Figuras 77G y H).

Tras el análisis estereológico (Figura 77I), se observa que el grupo de 6-OHDA presenta unos valores muy bajos de neuronas ( $780,43 \pm 450,43$ ) / mm<sup>3</sup>, no siendo significativamente ( $p=0,0001$ ) diferentes al número de neuronas dopaminérgicas en el grupo tratado con LPS ( $1262,89 \pm 301,80$  / mm<sup>3</sup>). El grupo tratado con LPS + rADSCs con un valor de ( $3541,38 \pm 1394,55$ ) / mm<sup>3</sup> es significativamente ( $p=0,0001$ ) diferente. Esto significa que, aunque no se consigue proteger completamente del daño, si se mejora el número de neuronas dopaminérgicas en un 28%, con respecto a los grupos dañados con 6-OHDA y LPS.

Por consiguiente, podemos deducir que las rADSC implantadas provocan una disminución significativa en la activación microglial, después de 4 meses, protegiendo en parte de la neurodegeneración. Aun así existe una diversidad en la respuesta neuroprotectora, pues la desviación estándar es alta, con niveles de neuronas que están entre  $4980,33$  / mm<sup>3</sup> y  $1719,19$  / mm<sup>3</sup>.



**Figura 77. Determinación del número de neuronas dopaminérgicas.** A-H Imágenes obtenidas en microscopio óptico, tras la realización de una inmunohistoquímica para TH revelada con DAB. Las imágenes A y B corresponden al grupo control, C y D corresponden al grupo de 6-OHDA, E y F corresponden al grupo LPS y, G y H corresponden al grupo LPS + rADSC. La barra de escala de color blanca es de 500  $\mu\text{m}$ , y la de color negro es de 200  $\mu\text{m}$ . I: Diagramas de barras que representan el n° de células /mm<sup>2</sup>  $\pm$  desviación estándar, frente a cada grupo de animales. <sup>a</sup>Significativo (N=4, p=0,0001) respecto al grupo Control. <sup>b</sup>Significativo (N=4, p=0,0001) respecto al grupo 6-OHDA. <sup>c</sup>Significativo (N=4, p=0,0001) respecto al grupo LPS.

## **V. DISCUSIÓN**

---



Existe un gran interés en torno a la biología de las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSCs), cuyos beneficios terapéuticos potenciales son especialmente prometedores en el envejecimiento y enfermedades relacionadas. El conocimiento de la ciencia básica sobre las ADSCs puede ayudar a comprender mejor su funcionamiento y a mejorar los tratamientos clínicos en el futuro (von Tigerstrom, 2009). De hecho, la “Food and Drug Administration (FDA)” americana establece, específicamente en sus directrices, que la aplicación de células madre exige un previo conocimiento y exploración de la actividad biológica de estas células “procesadas” (Halme and Kessler, 2006).

Investigar con los cultivos primarios de las células multipotentes presentes en las fracciones vasculares estromales (SVF) del tejido adiposo es más ventajoso que hacerlo basándose en líneas celulares de adipocitos. Primeramente, las líneas celulares han sido sometidas a continuos pases en cultivo. En un segundo lugar, las células primarias (células madre) pueden obtenerse de humanos o animales en diferentes etapas de su desarrollo (efecto de la edad, envejecimiento). Y, en tercer lugar, cabe también la posibilidad de que estas células se obtengan de tejido adiposo de humanos obesos, o de animales con obesidad provocada, hormonal o nutricionalmente.

Las células madre mesenquimales (MSCs) habitan en casi todos los órganos y tejidos. Si bien las células madre de médula ósea (BM-MSCs) han sido extensamente estudiadas, las propiedades de las ADSCs no han sido totalmente caracterizadas. Estas últimas presentan ciertas ventajas sobre las de médula ósea (Gimble and Guilak, 2003), entre otras, facilidad de obtención de abundante tejido adiposo, una mayor frecuencia de replicación y una cinética más activa a la hora de alcanzar una confluencia mínima. Todo esto convierte al tejido adiposo en una fuente preferencial de células madre mesenquimales (Chen *et al.*, 2006; Fraser *et al.*, 2006; Schäffler and Büchler, 2007).

Cuando aislamos mecánicamente el tejido adiposo, humano o animal, en realidad se dispone de una mezcla heterogénea de la fracción estromal derivada del tejido adiposo. Esta mezcla, es fuente de distintos tipos de células multipotentes, localizadas en las paredes de los vasos sanguíneos. En el estroma, residen tres subpoblaciones distintitas estromales:

- Progenitoras sub-endoteliales (SP), como los pericitos, la sub-fracción con más potencialidad.
- Sub-población estromal adiposa supra-adventicial (SA-ASC), que son las células más prevalentes.

- Sub-población transicional de progenitores sub-endoteliales (SP-TP), o población de transición entre las dos primeras.

Ambas, pericitos y células estromales adiposas supra-adventiciales, dan origen a las ADSCs (Tallone *et al.*, 2011).

Parte de nuestro trabajo se ha centrado en caracterizar las células madre de tejido adiposo, contenidas dentro de la SVF, en términos de proliferación, fenotipo y potencial de diferenciación.

## **V.1 CARACTERIZACIÓN (ADHERENCIA, FENOTIPADO, MULTIPOTENCIALIDAD) DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO (hADSC) Y DE RATA (rADSC)**

El primer objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de las ADSCs, ya que existe una elevada controversia en cuanto a la funcionalidad y selección de MSCs según si la fuente tisular es cordón umbilical, médula ósea o tejido adiposo, entre otros (Kern *et al.*, 2006; Gimble *et al.*, 2007; Schäffler and Büchler, 2007; Han *et al.*, 2015). Téngase en cuenta que hay una mayor heterogeneidad de poblaciones celulares en las diferentes fracciones vasculares estromales, que en el caso del tejido adiposo, serían poblaciones tan diversas como las mencionadas con anterioridad, siendo objeto de debate dónde se encuentran realmente las MSCs (Crisan *et al.*, 2008; Díaz-Flores *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Tallone *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014). Sin embargo, las incógnitas sobre el origen, la heterogeneidad de las poblaciones, las diferentes propiedades de las MSCs de distintos tejidos y otras pueden, en teoría, abrir un abanico de posibilidades terapéuticas (Dar *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2010; Kapur *et al.*, 2015). La “International Society for Cellular Therapy” (ISCT), a través de sus comités “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee” (MTSCC) e “International Federation for Adipose Therapeutics and Science” (IFATS), establece una serie de criterios para definir estas poblaciones y la utilización de los acrónimos en relación a las células madre, ya que no hay aún un consenso claro en la literatura científica sobre el uso de los mismos (Bourin *et al.* 2013; Carelli *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2014; Ogura *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2015). Por ejemplo, no parece adecuado identificar a las células madre de tejido adiposo con el acrónimo “ASC” pues podría fácilmente confundirse con el de células madre adultas (ASC). En esta Tesis se ha optado por el acrónimo “ADSC” para referirnos a las células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo.

De los tres criterios indispensables establecidos por el “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee” de la ISCT, para la identificación y caracterización de células madre mesenquimales, dos de ellos, la adherencia al plástico y la multipotencialidad, ya se solía emplear para definir las células madre mesenquimales. La expresión de marcadores de superficie específicos (fenotipado) determina el tipo particular de “célula madre”. La expresión de estos antígenos o marcadores no está aun universalmente caracterizada (Tropel *et al.*, 2004). Cuando empleamos la terminología “células estromales mesenquimales multipotentes” nos estamos refiriendo, única y exclusivamente, a las células del estroma (armazón tisular que sostiene los elementos celulares) que son mesenquimales<sup>8</sup> (o sea, adherentes al plástico) y multipotentes (o sea, capacidad de experimentar una diferenciación celular, al menos, hasta adipocitos, osteoblastos y condrocitos). Dentro del amplio conjunto de células mesenquimales residen las “células madre”. Pero esta peculiaridad debe ponerse de manifiesto siempre y cuando expresen determinados antígenos de superficie celular. El linaje de cada célula madre se identifica a través de estos epítomos de proteína, marcadores específicos que no expresan las células somáticas (Tárnok *et al.*, 2010). La citometría de flujo, mediante anticuerpos monoclonales acoplados a fluoróforos, puede detectar más de 6-8 marcadores al mismo tiempo (Adams *et al.*, 2009; Preffer and Dombkowski, 2009).

Las ADSCs muestran distintos patrones de marcadores de superficie que las células madre de medula ósea (BM-MSCs) o de sangre de cordón umbilical (UCB-MSCs) (Zuk *et al.*, 2002). Además, los perfiles transcripcionales del tejido adiposo de la región abdominal (humanos) o de la región vaso-ventral (rata) pueden ser distintos a los de otras regiones anatómicas del tejido adiposo (Tchkonina *et al.*, 2007). Igualmente, el perfil del fenotipado se ve afectado por el método de aislamiento del tejido adiposo, las condiciones de cultivo, el número de pases o el tipo de metodología (inmunohistoquímica, citometría de flujo) usada en el fenotipado (Zuk *et al.*, 2002; Krampera *et al.*, 2013).

En el fenotipado de las rADSC el resultado es una expresión fuertemente positiva ( $\geq 95\%$ , según ISCT) tanto para el marcador CD90 (99%) como para el marcador CD29 (99%) (Tabla 7, Figura 17), ambas moléculas de adhesión características de células mesenquimales y clásicas de células estromales (Bailey *et al.*, 2010; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2015). CD90 se expresa en células de la región supra-adventicial (envoltura externa del vaso sanguíneo) y es comúnmente relacionado con progenitores osteogénicos (Lin *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2015)

---

<sup>8</sup> Esta multipotencialidad ya va implícita en el término “mesenquimal”.

mientras que CD29 es característico de progenitores adipogénicos. Ambos demuestran la capacidad de las rADSC a la diferenciación adipogénica y osteogénica (Davies *et al.*, 2015). A la vez, debe existir una expresión “negativa” (~10%) para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 (Tabla 7, Figura 17). CD34 es una glicoproteína de la región supra-adventicial, cuya cualidad hematopoyética fue detectada por Gronthos *et al.*, (2003). CD45 es un marcador de leucocitos, expresado con muy baja intensidad (0-11%). Como CD45 y CD34 son marcadores característicos para las células sanguíneas circulantes, se demuestra que las ADSCs caracterizadas no están contaminadas con líneas celulares hematopoyéticas.

Aunque CD34 puede expresarse positivamente en la SVF recién aislada, por ser característico de las células mesenquimales primitivas, este marcador se pierde rápidamente durante el cultivo, a través de los sucesivos pases y, finalmente, deja de expresarse (Suga *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2010).

En cuanto a las hADSCs, los marcadores CD73, CD90 y CD105 se expresan con una intensidad superior al 99% (fuertemente positivo). CD73 es una enzima de superficie, que se expresa consistentemente en células adipocíticas humanas (Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2015). CD105, que no se expresa en ratas, es característico de células madre de tejido adiposo de humanos, al igual que el marcador CD271 (receptor de baja afinidad del factor de crecimiento del nervio, LNGFR), y se trata de una molécula de adhesión, cercana a los pericitos, y de las células estromales (Lin *et al.*, 2008; Bailey *et al.*, 2010). Kern *et al.*, (2006) y Haasters *et al.*, (2009) consiguen intensidades de positividad en el intervalo de 88-90%, menores de los aquí conseguidos. Esto puede deberse al empleo del aislamiento inmunomagnético, más selectivo, usando antígeno de superficie CD271 (LNGFR) (Quirici *et al.*, 2002; Álvarez-Viejo *et al.*, 2015).

Pittenger *et al.*, (1999) elucidaron al final de los 1990s el potencial multilinaje de las células madre mesenquimales, diferenciándolas hasta adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Existen factores que pueden influir en el potencial de diferenciación, como el grado de homogeneidad alcanzado después de los sucesivos pases y la densidad celular empleada (si es demasiado alta podría darse una diferenciación espontánea). El cumplimiento de los criterios de adherencia y expresiones correcta de marcadores en el fenotipado, junto con la diferenciación hasta adipocitos y osteoblastos, otorgan la tipificación de célula madre “competente”. La necesidad de extensos periodos de cultivo, junto con una morfología no del todo homogénea y la manifestación de una pluripotencialidad no demasiado evidente,

tipifican a la célula madre como “menos competente” (Catalina *et al.*, 2008). Una célula madre es “muy competente” o “idónea” si exhibe una extensa capacidad de proliferación, morfología homogénea (forma celular tipo fibroblasto), cumplimiento con el fenotipado específico requerido y presenta una evidente capacidad de diferenciación (Dominici *et al.*, 2006).

Supuestamente, a las 2-3 semanas de cultivo de inducción adipogénica se deben apreciar grandes vacuolas y a las 3 semanas se deben poder detectar por tinción con Oil Red O. En humanos, a los 21 días, el ensayo de tinción (rojo) es muy evidente, como se puede apreciar en las imágenes de la Figura 15. En el caso de las ratas, ya a los 14 días es bastante visible la diferenciación adipogénica (Figura 18), incluso sin necesidad de tinción. Estos resultados están completamente de acuerdo con los obtenidos muy recientemente (González-Fernández *et al.*, 2015), usando tejido abdominal e inguinal de rata. Si la inducción adipogénica sucede antes de 12 días, en la tinción se observan muy pocos adipocitos. Ocurriría que estas células diferenciadas tempranamente no han logrado adherencia y se han desprendido del cultivo base antes del final estimado del período de inducción (Bonab *et al.*, 2006).

Los osteoblastos se pre-identifican al microscopio por apariencia cuboide. Después de 10 días de cultivo en el medio diferenciador se detectaron claramente los osteoblastos en humanos (Figura 15). En ratas, el período de diferenciación ocupó 2-3 semanas, con resultados similares (Figura 18). La diferenciación condrogénica sólo se ha realizado para células rADSC (Figura 18), empleándose inmunohistoquímica por fluorescencia para determinar la expresión de colágeno tipo III. Otros autores la llevan a cabo por tinción con Alcian blue (González-Fernández *et al.*, 2015), que detecta la presencia de los proteoglicanos de la matriz extracelular. La diferenciación a condroblastos en humanos, no es considerada imprescindible. Otros autores realizan exclusivamente la determinación a osteoblastos y adipocitos (Fehrer *et al.*, 2006; Gala *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2013; Carelli *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2014; Markarian *et al.* 2014; Yoon *et al.*, 2014) siempre y cuando se cumpla consistentemente con los requisitos de fenotipado de la ISCT (>90% para marcadores positivos y, <2% para marcadores negativos). En 2013, la IFATS publicó una ampliación de los anteriores criterios (Bourin *et al.*, 2013), proponiendo nuevos marcadores positivos y negativos, incluso habilitando marcadores secundarios alternativos, con el objetivo de identificar poblaciones heterogéneas con mayor detalle, de ahí que hayan añadido más marcadores positivos pero con un nivel de exigencia menor (desde un 90 a un 80%). De todos

modos, en ningún momento se derogan los criterios descritos en 2006 por la ISCT, y de hecho, en la literatura científica se siguen manteniendo (Sousa *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2014).

Para la descripción de los mismos criterios en otras especies aún no existe consenso definitivo. Dominici *et al.*, (2006) dejan entrever que los mismos criterios se podrían establecer para otras especies, aunque definiendo otra serie de marcadores de superficie, ya que podrían no compartir las mismas características fenotípicas que las células humanas. En el caso de las ratas, a día de hoy, no existe un consenso sobre qué criterios deben reunir las rADSCs para ser consideradas MSC, siendo varios los autores que intentan mimetizar los criterios (Pountos *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2014). La utilización en nuestro caso de CD90.1 y CD29, como marcadores de superficie positivos, y CD11b/CD34/CD45, como negativos, se ha basado en los usados por otros autores (Carelli *et al.*, 2014; Davies *et al.*, 2015) y en los certificados de análisis de empresas que comercializan MSCs de rata (Lonza, Wakersville, MD, USA).

En nuestro trabajo hemos comprobado que con la separación magnética se obtienen poblaciones más homogéneas en rata y una identificación más selectiva que las obtenidas por investigadores que emplean otros métodos (Gala *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2015), lo cual pone de manifiesto las ventajas del aislamiento inmunomagnético. Otro aspecto importante en las MSCs es el nivel de los factores de pluripotencialidad implicados en la capacidad de auto-renovación y diferenciación en varias líneas celulares (Ho *et al.*, 2005; Gimble *et al.*, 2007; Bajada *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2015; Kapur *et al.*, 2015). Si el objetivo de la terapia celular es reparar, reemplazar y regenerar tejidos dañados es importante conocer qué capacidad de auto-renovación tienen las células que implantamos y si podrán diferenciarse. En nuestro caso, la potencialidad se ha evaluado mediante la cuantificación de los niveles de las proteínas Nanog y Sox2. Nanog se ha usado como indicador de potencialidad en otros experimentos (Siegel *et al.*, 2013; Carelli *et al.*, 2014) y Sox2 se encuentra muy relacionada con la auto-renovación de las MSCs y su diferenciación hasta osteoblastos y adipocitos (Seo *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2014).

## **V.2 EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LAS ADSCs**

Muchos de los cambios moleculares que ocurren en el envejecimiento se encuentran muy bien descritos en distintos tejidos de nuestro organismo (Ryazanov and Nefsky, 2002; Proud, 2007; Hands *et al.*, 2009; Laplante and Sabatini, 2012; Leprivier *et al.*, 2013; Auley *et*

*al.*, 2015), pero menos en las células madre. Cada vez son más los autores que hacen hincapié en la importancia de investigar cuáles son las rutas bioquímicas que se pueden ver afectadas por el envejecimiento en estas células (Ho *et al.*, 2005; Sethe *et al.*, 2006; Pantovic *et al.*, 2013; Gharibi *et al.*, 2014; Mazzoccoli *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015). En esta Tesis nos hemos centrado en ver cómo se alteran en las ADSCs con el envejecimiento determinadas proteínas que ya han sido estudiadas por nuestro grupo de investigación en diferentes tejidos y condiciones metabólicas: eEF2, SIRT1, AMPK $\alpha$  y PGC1 $\alpha$ .

eEF2 está implicado en la etapa de elongación de la síntesis de proteínas (SP). Concretamente, es la proteína que cataliza el desplazamiento del ribosoma a lo largo del mRNA. Puesto que no hay proteínas de reserva, la síntesis de proteínas es un proceso fundamental (Liu and Barrett, 2002; Gebauer and Hentze, 2004) y está regulada *in vivo* por muchos factores y condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (ayuno, ejercicio, hormonas, factores de crecimiento, enfermedades y envejecimiento) (Proud, 2002; Abbot and Proud, 2004)

En muchas ocasiones, las células son probablemente tolerantes a fluctuaciones en los niveles de las proteínas. Sin embargo, en otros casos, la SP tiene que ser estrictamente regulada, sobre todo en aquellas proteínas celulares implicadas en puntos estratégicos de control, como la regulación de la apoptosis, la progresión del ciclo celular y la diferenciación. En cuanto a la regulación, es razonable que el control de la traducción esté mediado fundamentalmente por la eficacia del proceso de iniciación y que la etapa de elongación cambie de forma coordinada (Browne and Proud 2002). Sin embargo, la elongación se regula específicamente por muchos factores y circunstancias metabólicas. De hecho, varios trabajos indican que el control de la elongación es importante en el ciclo celular, la acción hormonal y de mitógenos y durante el estrés oxidativo y patologías como el cáncer, lupus eritematoso y dermatitis atópica, las cuales se han asociado con cambios en los factores de elongación (Ayala *et al.*, 1996; Ejiri, 2002). También, hay que destacar que algunos mRNA son menos dependientes de la etapa de iniciación y los ribosomas inician la lectura del mRNA en una secuencia denominada “internal ribosome entry” (IRE) (Komar *et al.*, 2012). La presencia de secuencias IRE en algunos mRNA permite su transcripción en condiciones en las que la traducción “cap-dependiente” se encuentra comprometida, por ejemplo, por el estrés oxidativo, el cual produce una inhibición de la síntesis global de proteínas, fundamentalmente a nivel de la etapa de iniciación. Bajo estas condiciones de oxidación se produce generalmente la traducción selectiva de proteínas específicas que se requieren para responder a las

condiciones adversas. Si bien una característica de la “traducción IRE” es que no depende de la etapa de iniciación, todavía depende de los factores de elongación, entre ellos el eEF2. Es en la traducción de estos mRNA donde especialmente los factores de elongación pueden ser las dianas para la regulación de la SP en distintas condiciones.

Cuando los organismos envejecen se produce una disminución considerable de la SP similar a la que se produce tratando animales jóvenes con compuestos oxidantes (Ryazanov and Nefsky, 2002; Rattan, 2010). Esto conlleva a una menor disponibilidad de proteínas para el mantenimiento, reparación y funcionamiento normal de la célula. En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto que la etapa de elongación resulta especialmente afectada con el envejecimiento (Ayala *et al.*, 1996; Parrado *et al.*, 1999; Piwien-Pilipuk *et al.*, 2002) y hemos podido comprobar que si el hígado de una rata joven tarda en leer un mRNA de tamaño medio 60 s, el de una rata vieja lo hace en 240 (Parrado *et al.*, 1999). Este enlentecimiento está relacionado con las alteraciones que sufre el eEF2. Con la edad, esta proteína pierde actividad, disminuyen sus niveles, presenta un mayor nivel de oxidación en su molécula y se fragmenta específicamente por acción de los agentes lipoperoxidantes (Parrado *et al.*, 2003; Argüelles *et al.*, 2006) y no por acción de otros compuestos oxidantes.

A pesar de la gran cantidad de bibliografía existente sobre la traducción y su regulación, sólo hay un estudio y muy reciente sobre la síntesis de proteínas en SCs (Signer *et al.*, 2014). Según este estudio, las SCs sintetizan mucha menos cantidad de proteínas en relación a otras células (están quiescente la mayoría del tiempo). Esto indica que el mecanismo de regulación debe ser finamente ajustado por mecanismos que se desconocen aún, de forma que la baja velocidad de síntesis de proteínas puede ser esencial para mantener su homeostasia metabólica.

Al contrario de lo que ocurre en hígado, los resultados de esta Tesis muestran que los niveles de eEF2 tienden a aumentar con la edad en las hADSCs, existiendo una gran variabilidad entre personas, lo cual sería necesario considerar para realizar una terapia celular personalizada. En las rADSCs encontramos una tendencia similar y los niveles de eEF2 aumentaban con la edad (Figura 24).

El aumento observado en los niveles de eEF2 de las ADSCs no concuerda con el hecho de que en hígado, y otros tejidos, los niveles de eEF2 disminuyan (Argüelles *et al.*, 2009; Argüelles *et al.*, 2011; Argüelles *et al.*, 2012), ni con que en el envejecimiento se produzca una disminución generalizada de la síntesis de proteínas (Parrado *et al.*, 1999;

Argüelles *et al.*, 2011; Leprivier *et al.*, 2013). Estos resultados ponen de manifiesto que lo que ocurre en las ADSCs no es exactamente igual que lo que pueda ocurrir en otros tejidos del organismo.

Obviamente, los órganos difieren en tamaño, estructura y función y están sujetos a multitud y diferentes estímulos biológicos y físicos que, de alguna manera, van a determinar la “demanda de regeneración”. Según su función, las células de cada tejido van a estar sometidas a un envejecimiento cronológico y replicativo. El envejecimiento cronológico va a depender de la actividad metabólica de los dos procesos biológicos que generan especies reactivas de oxígeno, como son la respiración mitocondrial y las reacciones de destoxificación. Paralelamente, todas las células de un individuo pueden estar sujetas a especies oxidantes de origen exógeno, en cuyo caso se produciría una afectación general, incluyendo las SCs. Esto determinaría la diferencias entre envejecimiento biológico y patológico. En el primer caso, las SCs solo tendrían que “atender” las demandas de regeneración tisular de aquellas células dañadas por las propias actividades metabólicas generadoras de radicales libres, las cuales diferirán entre individuos. Hipotéticamente, cuanto más daño se produzca en los tejidos, más demanda tendrán las SCs para llevar a cabo su función con fines reparadores. El grado de respuesta de las SCs dependerá de estímulos externos, la capacidad de división, o la capacidad de diferenciación, los cuales son procesos que pueden estar relacionados con los diferentes hábitos de vida y genética del individuo, determinando así el fenotipo de envejecimiento.

Si al daño endógeno, le sumamos las fuentes exógenas de oxidación, que alteran por igual a todas las células del organismo, incluidas las SCs, éstas no podrían atender las demandas regenerativas de cada tejido, lo que conllevaría una pérdida acelerada de las funciones fisiológicas.

A modo de resumen de esta parte, supuestamente las SCs deben de tener más actividad a medida que envejecemos, puesto que con el envejecimiento se acumulan los errores y los daños moleculares. Un “buen envejecimiento” supondría que las SCs no estuvieran dañadas (bien por su baja actividad metabólica, bien por ausencia de daño exógeno) y se activara su funcionamiento cuando hubiese que reparar. Para ello, deberían contar con toda la maquinaria de traducción en estado óptimo. Por el contrario, un “mal envejecimiento” es aquel en el que las células de los tejidos están dañadas, incluidas las SCs

(en este caso, también por estrés oxidativo exógeno) y, consecuentemente, tendrían poca capacidad regenerativa.

En todo caso, un envejecimiento biológico en condiciones naturales debe cursar con poco daño interno causado por la propia actividad metabólica y una alta capacidad de reparación en células somáticas, y un estado quiescente, con bajo daño interno y alta capacidad de reparación, en caso de daño, en células madre. En ambos casos es necesario que la exposición a fuentes exógenas de radicales libre sea baja. Es decir, que para que el efecto del envejecimiento sobre las funciones tisulares sea mínimo se tienen que dar unas circunstancias específicas en las que diferentes rutas metabólicas cambien de forma coordinada en las células somáticas y en las SCs para responder ante las agresiones por oxidación. En el momento en que uno de los “protagonistas” no esté presente en el sitio adecuado y en condiciones óptimas no se restablecerán las condiciones de homeostasia iniciales o no se amortiguarán convenientemente los efectos negativos de los daños celulares.

Varias proteínas que afectan al envejecimiento y la longevidad tienen como diana al eFE2, siendo una de ellas es la AMPK $\alpha$  (Horman *et al.*, 2002). Esta proteína se activa en respuesta a un aumento en la relación de AMP respecto a ATP en el interior de la célula y, por lo tanto, actúa como un eficiente sensor del estado energético celular. AMPK $\alpha$  se activa por estrés patológico como la ausencia de glucosa, isquemia, hipoxia, estrés oxidativo y estrés hiperosmótico. A excepción del último, todos están asociados con un aumento en la razón AMP: ATP celular (Long and Zierath., 2006; Cantó *et al.*, 2009). Con el objetivo de mantener el balance energético celular, la activación de AMPK $\alpha$  va a inhibir rutas anabólicas y otros procesos que consuman ATP, mientras que va a activar rutas catabólicas que generen ATP. Estos efectos se alcanzan tanto por fosforilación directa de enzimas metabólicas así como a través de efectos a largo plazo por la regulación de la expresión génica. Cuando la disponibilidad de energía es baja, mTORC1 es inhibida por AMPK $\alpha$ , que también fosforila eFE2, inhibiéndose la traducción, lo que permite preservar la energía para procesos celulares de respuesta al estrés que promueven el mantenimiento y la supervivencia celular.

Pero la AMPK $\alpha$  no sólo se encarga de responder ante el estado energético de la célula, sino que también participa en la diferenciación de las SCs. En relación a la diferenciación, se ha descrito que AMPK $\alpha$  favorece la diferenciación a osteoblastos a la vez que inhibe la diferenciación a adipocitos (Chen *et al.*, 2014). Nuestros resultados muestran que la expresión de esta proteína disminuye en las hADSCs con la edad (Figura 23), lo cual

puede contribuir/justificar la propensión a la acumulación de grasas cuando se cumplen años. Otra consecuencia de unos niveles disminuidos de AMPK $\alpha$  es que se pierde su efecto inhibitor sobre la ruta mTOR, la cual activa la síntesis de proteínas. De hecho, en las ADSCs aumentan los niveles de eEF2 de forma paralela a la disminución de los niveles de AMPK $\alpha$ .

Indudablemente, en el caso de las ADSCs, la capacidad regenerativa implica lo que seguramente no ocurre en otros tejidos distintos al tejido adiposo, que es el aumento o el mantenimiento de la capacidad para acumular grasas, puesto que lo que se van a generar son supuestamente adipocitos. Teniendo en cuenta que la obesidad es fuente de muchos problemas de salud, se podría pensar que la capacidad regeneradora de las ADSCs tiene “efectos secundarios”, es decir, que podría contribuir a la obesidad. Sin embargo, quizás haya que tener en cuenta que durante centenares de miles de años los homínidos se alimentaron con frecuencia variable, debiendo acumular reservas de grasa y proteína hasta su próxima ingesta, en cuyo caso, contar con depósitos de reservas podría ser fundamental para la supervivencia, todo lo contrario de lo que ocurre actualmente, en la que abunda el sedentarismo y una alimentación asegurada.

Una disminución de AMPK $\alpha$  con la edad se observó también en rADSCs (Figura 25). En ratas puede observarse que el grupo joven presentó niveles de AMPK $\alpha$  bajos con respecto a los animales de más edad. Estos resultados son similares a lo que fueron descritos en retina por Samuel *et al.*, 2014. Sin embargo, no parecen concordar con lo descrito por otros autores (Ido *et al.*, 2015). En cierta manera, y en concordancia con nuestros resultados, durante la edad joven se produce un aumento de la síntesis proteica y ello requiere teóricamente de unos niveles de AMPK $\alpha$  disminuidos para que se pueda producir la proliferación y diferenciación de los tejidos para alcanzar la madurez. Durante la edad adulta los niveles de eEF2 disminuyen y los de AMPK $\alpha$  aumentan, quizás debido en principio a que no hay necesidad de generar nuevos tejidos (excepto en casos de reparación), solo de mantenerlos. Finalmente, durante el envejecimiento esta situación se vuelve a invertir, pues tenemos valores elevados de eEF2 y bajos de AMPK $\alpha$  (Figuras 24 y 25), probablemente debido a que las ADSCs tienen que atender la demanda regeneradora de los tejidos envejecidos.

SIRT1 interviene en numerosas rutas bioquímicas importantes desde el punto de vista del envejecimiento, incluyendo la reparación del DNA, la respuesta inflamatoria, función mitocondrial, ciclo celular, apoptosis, capacidad anti-envejecimiento, anti-oxidativa,

anti-mitótica y de regulación metabólica (Auley *et al.*, 2015; Ido *et al.*, 2015) . Su actividad es regulada por la disponibilidad de nutrientes, siendo inducida por la restricción calórica, la cual actúa activando la AMPK $\alpha$  y aumentando los niveles de NAD (López-Lluch and Navas, 2015; Watroba and Szukiewicz, 2016).

Nuestros resultados muestran una tendencia a la disminución de los niveles de SIRT1 con la edad en las hADSC (Figura 23), lo que supuestamente es coherente con las tendencias observadas en eEF2 y AMPK $\alpha$ , siendo por tanto la disminución de SIRT1 un indicador de envejecimiento (Hands *et al.*, 2009; Laplante and Sabatini, 2012; Leprivier *et al.*, 2013; Gharibi *et al.*, 2014).

PGC1 $\alpha$  se determinó también en las ADSCs de rata (Figura 27) por ser una proteína clave en la regulación del metabolismo, siendo sus niveles de expresión bajos en hígado y tejido adiposo (Liang and Ward, 2006; López-Lluch *et al.*, 2008) Esta proteína puede inducir la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos cuando se necesita energía para la síntesis de proteínas, mediante la activación de la ruta mTOR (Laplante and Sabatini, 2012). También puede inducir la transcripción de genes gluconeogénicos, por acción de SIRT1 (Rodgers *et al.*, 2005), puede promover la biogénesis mitocondrial, por activación de AMPK $\alpha$  (Jäger *et al.*, 2007) y otras organelas (Bagattin *et al.*, 2010), e interviene en la protección frente al estrés oxidativo (Wenz *et al.*, 2009; Austin and St-Pierre, 2012) aumentando la expresión de enzimas detoxificadores de ROS (St-Pierre *et al.*, 2006).

El papel fisiológico de esta proteína ha sido muy estudiado en distintos tejidos, pero menos se conoce acerca de su función en las células madre, con lo cual las consecuencias metabólicas de la disminución de PGC1 $\alpha$  en estas células deben ser estudiadas en profundidad para establecer si, por ejemplo, la disminución de la fosforilación oxidativa o de la oxidación de lípidos, consecuentes a la disminución de estas proteínas tiene repercusiones en la capacidad regenerativa o de diferenciación de las células madre.

Los agentes oxidantes que hemos utilizado para evaluar la resistencia al estrés oxidativo de las células madre han sido menadiona (MD), cuyo efecto está caracterizado por la producción de iones superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Criddle *et al.*, 2006; Klotz *et al.*, 2014), e hidroperóxido de cumeno (CH), que genera peroxidación lipídica y formación de aductos entre los aldehídos originados con las proteínas y DNA (Argüelles *et al.*, 2013; Ayala *et al.*, 2014). Nuestros resultados evidencian una disminución progresiva de la viabilidad conforme aumenta la concentración del agente oxidante. Mientras que al usar MD la disminución es

rápida y progresiva, el efecto del CH se observa a dosis más altas del oxidante (Figura 34). En ambos casos, las ADSCs parecen ser más resistentes al estrés oxidativo que otros tipos celulares como por ejemplo HeLa (Figuras 34 y 39). En relación a la peroxidación lipídica, las hADSCs ofrecen más resistencia que las rADSC (Figura 39). La mayor resistencia al estrés oxidativo por las ADSCs ha sido corroborado por otros autores, demostrando que estas células pueden aumentar la expresión de SIRT1 y la capacidad antioxidante como respuesta a la acción oxidante (Valle-Prieto and Conget, 2010; Park *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015a).

En lo que se refiere al efecto de la edad sobre la resistencia al estrés, observamos que a dosis bajas no hay diferencias en la viabilidad, entre MD y CH (Figuras 35 y 37). Sin embargo, al ir aumentando la dosis, la respuesta es diferente para MD y CH. Ejemplo de ello es que la muestra de mayor edad (48 años) es tan resistente a MD como las de menor edad (Figura 36). Sin embargo, es la más sensible a CH (Figura 38). Estos resultados evidencian que existe una variabilidad en el efecto de las diferentes especies reactivas de oxígeno, no estando correlacionado con la edad.

Lo que si parece estar relacionado con la edad son los cambios en los niveles de factores de pluripotencialidad Nanog y Sox2. En hADSCs, los niveles de Sox2 disminuyen con la edad, lo que no ocurre con Nanog (Figura 28), al igual que observó Siegel *et al.*, (2013) en BM-MSC. Si dividimos las muestras de hADSC en dos grupos, el de mayor edad tiene niveles de Nanog significativamente más bajos. En rADSCs la tendencia a disminuir los factores de potencialidad con la edad es similar, aunque con algunos matices. Mientras que Nanog tiene ya niveles bajos durante la edad adulta, los niveles de Sox2 se mantienen y sólo disminuyen en la vejez (Figura 29). En resumen, lo que observamos es que durante la edad joven los niveles de ambos factores de transcripción son altos, lo que nos indica que en esa fase de la vida el circuito de Sox2-Nanog-Oct4 mantiene a las células madre en un buen estado de potencialidad. En la edad adulta, los niveles de Nanog disminuyen, por lo que el circuito Sox2-Nanog-Oct4 puede verse afectado; sin embargo, los niveles de Sox2, que es un regulador importante de la diferenciación adipogénica y osteogénica, se mantienen. Cuando se llega a la vejez, ambos factores están disminuidos. Hay que añadir que el número de ADSCs por gramo de tejido en animales jóvenes es mucho mayor que en los adultos y viejos, y entre estos dos últimos no existen diferencias (Figura 44).

La potencialidad no sólo está relacionada con mantener el estado de quiescencia y auto-renovación de las ADSCs, sino también con la capacidad de diferenciación. Niveles altos

de potencialidad indican que la célula tiene más probabilidades de diferenciarse. En las hADSC existe una correlación lineal positiva entre la edad y la diferenciación hasta adipocitos, siendo las células de mayor edad las que se diferencian en mayor cantidad (Figura 30). Este resultado no se correlaciona con los obtenidos por Zhu *et al.*, (2009) y Siegel *et al.*, (2013), quienes no encuentran distinciones de diferenciación entre las distintas edades. Probablemente, este hecho se deba a que estos autores usan un rango mayor de edades (20-80 años). Podríamos decir que, dentro de una edad adulta, las células hADSC de mayor edad tienden a diferenciarse más a adipocitos que las de menor edad. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de realizar una serie de determinaciones en hADSCs antes de usarlas en terapia celular. Los resultados obtenidos en animales reflejan que existe una disminución en la capacidad de diferenciación hasta adipocitos con la edad (Figura 31), no existiendo diferencias en la diferenciación entre las edades joven y adulta, pero sí en la de mayor edad (24 meses).

En la diferenciación de hADSCs hasta osteoblastos ocurre lo contrario, ya que la capacidad de diferenciación disminuye con la edad (Figura 32). Estos resultados sí son similares a los de Zhu *et al.*, (2009) y Siegel *et al.*, (2013). En el primer caso, utilizan un rango de edad muy similar al empleado por nosotros y obtienen los mismos resultados. En rADSCs, los resultados son muy parecidos a la diferenciación adipogénica. La diferenciación hasta osteoblastos es significativamente menor en animales viejos (Figura 33).

### **V.3 ESTUDIO *IN VIVO* DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO DE LAS RATAS CON HIDROPERÓXIDO DE CUMENO SOBRE LAS rADSCs**

Otro aspecto abordado es el efecto del CH *in vivo* sobre las mismas proteínas estudiadas *in vitro*, la potencialidad y la diferenciación de las rADSCs. Con la edad disminuye el número de células madre, lo cual está descrito con lo descrito por otros autores (Fehrer and Lepperdinger, 2005; Fehrer *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011). No obstante tras el tratamiento *in vivo* con CH los resultados demuestran que el número de rADSCs no se ve afectado por el estrés oxidativo, pero sí su viabilidad, convirtiéndolas más sensibles al proceso de aislamiento (Figura 44).

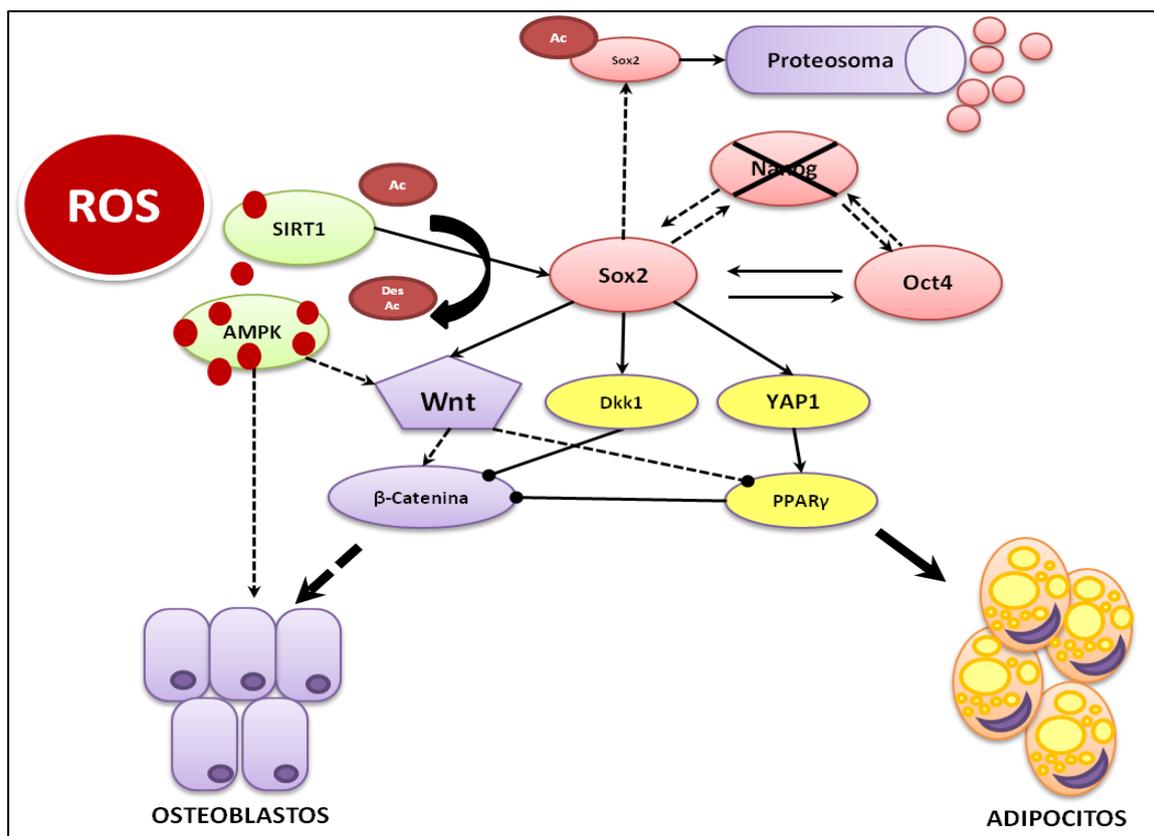
El tratamiento *in vivo* con CH también afecta a la homeostasis proteica y prueba de ello es la disminución a nivel hepático de eEF2 (Figura 47) y AMPK $\alpha$  (Figura 48), lo cual estaría de acuerdo con lo descrito por algunos autores (Long and Zierath, 2006; Niemann *et al.*, 2013; Leprivier *et al.*, 2014; Ido *et al.*, 2015). Sin embargo, estas proteínas no parecen

estar afectadas en rADSCs (Figuras 47 y 48). Por otro lado, SIRT1 aumenta en tejido hepático (Figura 49), probablemente como consecuencia de una respuesta antioxidante al CH inyectado (Ayala *et al.*, 2014; Leprevier *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015a), pero este aumento no es significativo en rADSC.

En cuanto a los factores de potencialidad Nanog y Sox2, existen diferencias significativas entre las rADSCs de los grupos tratados con respecto a los controles. Esto indica que el estrés oxidativo provocado por el tratamiento con CH está disminuyendo la potencialidad de las rADSCs, debido a que disminuyen los niveles de Nanog. Por otro lado, los niveles de Sox2 están aumentando (Figura 51) en los animales tratados. Este resultado ha sido descrito también por Park *et al.*, (2011), que observan cómo el estrés oxidativo aumentó la expresión de Sox2 y Oct4, pero sin hacer referencia a Nanog. Este efecto puede estar relacionado con los niveles altos de SIRT1, ya que SIRT1 desacetila Sox2, evitando que pueda ser degradado por el proteosoma (Yoon *et al.*, 2014). Un aumento de los factores de potencialidad plantea un problema a la hora de la diferenciación, pues a mayor capacidad multipotente mayor será la sensibilidad para diferenciarse cuando se reciba el estímulo de diferenciación. El aumento de Sox2, relacionado con la diferenciación adipogénica y osteogénica (Seo *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2014), nos hace pensar que las células de animales tratados *in vivo* con CH son más propensas a diferenciarse. Para comprobar esta posibilidad, sometimos ambos grupos de rADSC a la diferenciación adipogénica y osteogénica. Según Schönitzer *et al.*, (2014) las células con altos niveles de Sox2 presentan mayor estado de indiferenciación, inhibiéndose las rutas adipogénicas y osteogénicas. Cuando nuestras muestras se sometieron a procesos de diferenciación, los resultados mostraron un mayor número de adipocitos y un menor número de osteoblastos para aquellas rADSCs que provenían de animales tratados con CH. Está descrito que Sox2 favorece la diferenciación hasta adipocitos a través de la vía YAP1, en lugar de hasta osteoblastos a través de la vía Wnt (Seo *et al.*, 2013). Incluso se llega a asegurar que la propia proteína Sox2 promueve la diferenciación a adipocitos frente a la vía osteogénica. Sin embargo, en dichos estudios no se han tenido en cuenta ni el el estrés oxidativo ni la implicación de otras proteínas, como AMPK o SIRT1, que pueden modificar la funcionalidad de Sox2, favoreciendo la osteogénesis e inhibiendo la adipogénesis (Kim *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2014). Por ejemplo, los niveles altos de SIRT1 pueden estar desacetilando Sox2, evitando así que pueda ser degradada por el proteosoma (Yoon *et al.*, 2014). También los niveles disminuidos de AMPK $\alpha$ , que activa directamente la vía Wnt

(Chen *et al.*, 2014a) o de la  $\beta$ -catenina (Chang *et al.*, 2013), pueden estar implicados. Puede ocurrir que el equilibrio del estado de indiferenciación que mantendría el triángulo Oct4-Sox2-Nanog (He *et al.*, 2009) está desestabilizado por los bajos niveles de Nanog.

El motivo de los niveles bajos de Nanog en los animales tratados queda aún por resolver. Una posible explicación sería la activación de Caspasa-3 por acción de la peroxidación lipídica (Kang *et al.*, 2010), que actuaría sobre Nanog (Fujita *et al.*, 2008), rompiendo así el estado indiferenciado, de forma que Sox2 estaría sólo regulado por las señalizaciones de diferenciación. En definitiva, el esquema sería que el estrés oxidativo causa una sensibilización de las ADSCs hacia la diferenciación, aumentando los niveles de Sox2, producido por una respuesta metabólica elevando los niveles de SIRT1, cuya actividad evita que Sox2 se degrade. Se elimina, así, el estado indiferenciado disminuyendo los niveles de Nanog y permitiendo que Sox2 quede libre para dar su respuesta a la señalización diferenciadora. Por último, se promueve la diferenciación adipogénica frente a la osteogénica



**Figura 78.** Mecanismos moleculares por los cuales el estrés oxidativo afecta a la diferenciación de las ADSCs. Las flechas punteadas indican que la interacción en esa ruta es débil.

porque los niveles de AMPK, que propician la osteogénesis, están bajos o, como argumentan Seo *et al.*, (2013), porque Sox2 tiene capacidad adipogénica *per se* (Figura 78).

Fisiológicamente, todo ello se traduce en un aumento de la sensibilidad de las rADSCs a la señalización por inductores adipogénicos y resistencia a los osteogénicos, disminuyendo las reservas de rADSCs indiferenciadas disponibles para reparar, reemplazar o regenerar daños tisulares. Toda esta situación sería semejante a la que ocurre en el envejecimiento: menos células rADSCs, más adipocitos (sobrepeso-obesidad) y menos osteoblastos (osteocalcemia, osteoporosis, osteopenia), relacionando así la teoría de Harman con la incapacidad del organismo de regenerar tejidos durante la vejez.

En cuanto a la posible implicación del eEF2 en todos estos procesos, llama la atención el comportamiento distinto del eEF2 en hígado y en ADSCs cuando se estudian sus niveles en función de la edad y tras el tratamiento con CH (Figuras 23, 24 y 47). Estos resultados sugieren la existencia de unas particularidades de esta proteína en las células madre, que probablemente tengan que ver con los distintos mecanismos de regulación, que convergen en ella, de los cuales el más estudiado es la fosforilación en el citoplasma, que la inactiva al evitar su unión a los ribosomas (Browne and Proud, 2002). Sin embargo, hasta la fecha, el significado fisiológico de algunos de estos mecanismos de regulación, estudiados por nuestro grupo de investigación, son desconocidos. Cabe destacar que una disminución en sus niveles puede estar provocada por un aumento en la formación de aductos durante el envejecimiento y el estrés oxidativo, causado por fenómenos de peroxidación lipídica (Argüelles *et al.*, 2006; Argüelles *et al.*, 2009) y, por otro lado, a través de interacciones proteína-proteína (Argüelles *et al.*, 2013). Haber descrito la presencia del eEF2 en el núcleo de neuronas y astrocitos ha representado un fenómeno novedoso en la biología del eEF2 (Argüelles *et al.*, 2013). Además, hemos comprobado que el mantenimiento de sus niveles en estas circunstancias da lugar a un aumento de la supervivencia celular. Todos estos resultados indican que el eEF2 puede estar implicado en procesos celulares, aún por determinar, distintos de la síntesis de proteínas. Algunas de estas funciones del eEF2 presente en el núcleo pueden ser la interacción con otras proteínas, interacción con factores de transcripción y regulación de la expresión de genes implicados en los mecanismos de reparación, apoptosis y diferenciación.

Si el estrés oxidativo no sólo induce varios cambios en el eEF2, sino que también estimula la diferenciación a adipocitos e inhibe la diferenciación a osteoblastos, la

comparación de todas las modificaciones que sufre el eEF2 en las SC inducidas a diferenciarse a osteoblastos o adipocitos nos puede servir para entender el significado fisiológico de estas modificaciones y su importancia en la diferenciación, función y salud celular, sobre todo teniendo en cuenta que las SC inducidas a diferenciarse abandonan un estado quiescente caracterizado por una baja tasa de síntesis de proteínas. Probablemente, la inducción selectiva de la diferenciación a adipocitos por el estrés oxidativo y la inhibición paralela de la diferenciación a osteoblastos implique cambios diferenciales en los mecanismos de regulación del eEF2 (sobre todo teniendo en cuenta la sensibilidad de esta proteína a los compuestos oxidantes). En este esquema, no sería muy descabellado pensar que la inducción de la diferenciación a adipocitos por el estrés oxidativo implique la síntesis IRE y la inducción a osteoblastos, en otras condiciones, implique la síntesis de proteínas global.

#### **V.4 EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA RESISTENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO**

El uso de la criopreservación de las células madre es una práctica necesaria en investigación y en clínica, dado que su obtención y aplicación en la terapia celular no se lleva a cabo al mismo tiempo, siendo necesaria la presencia de agentes crioprotectores (CPAs).

El CPA más utilizado, sin duda, es el dimetilsulfóxido (DMSO), el cual lleva empleándose desde 1961 (Meagher and Herzig, 1993). La inclusión del DMSO en el líquido de criopreservación permite una conservación de mayor eficacia en el cultivo y a más largo plazo (Lee *et al.*, 2013). DMSO debe añadirse lentamente para prevenir un posible estrés osmótico, y a una baja temperatura (4°C), con el doble fin de rebajar su toxicidad y conseguir una óptima equilibración en sus niveles extra- e intracelulares (Cui *et al.*, 2007). También es importante considerar que la exposición celular al DMSO debe minimizarse hasta 1 min, pues un excesivo tiempo de penetración celular podría ocasionar apoptosis o dañar el DNA (Lasky, 1991; Tichon *et al.*, 2013).

En cuanto a qué concentración óptima debe tener el DMSO en el líquido de criopreservación, se han ensayado rangos de concentración diversos, comúnmente entre 5-20% v/v, pero en algunos casos también <5% y 40% v/v, pero nunca con resultados satisfactorios, aunque se acompañara de otros CPAs, como el HES (Meagher and Herzig, 1993; Donaldson *et al.*, 1996). Son muchas las referencias que manifiestan que la concentración más conveniente de DMSO es la del 10% v/v, siendo ésta la dosis empleada en los protocolos clínicos (Areman *et al.*, 1990; Fuller, 2004; Thirumala *et al.*, 2005). En nuestro

caso, además, existe una menor citotoxicidad y resistencia a CH en las ADSCs que fueron criopreservadas con DMSO al 10% v/v, frente a las que se criopreservaron usando concentraciones de 5% y 20% v/v (Tabla 8).

Generalmente, el medio empleado para la criopreservación contiene suero bovino fetal (FBS) u otro tipo de suero, ya que parece ser que las proteínas contenidas en el suero coadyuvan positivamente a la criopreservación (de Witte *et al.*, 1986). Nuestros resultados (Figura 40) indican que la presencia de suero mejora significativamente la viabilidad de las rADSCs frente al estrés oxidativo provocado *in vitro*, tendencia que es similar a la obtenida por González-Fernández *et al.*, (2015).

Otro parámetro importante del proceso de descongelación de SCs es averiguar qué tiempo es el más óptimo para que sean usadas en terapia celular y para ello determinamos cuanto tiempo podrían transcurrir en cultivo esas células sin que su capacidad de resistencia al estrés oxidativo disminuyera. Según nuestros resultados (Figura 41) parece deducirse que la susceptibilidad de las rADSCs al estrés oxidativo aumenta con el tiempo de cultivo después de la descongelación. Esta conclusión concuerda con los resultados obtenidos por Lee *et al.*, (2013), donde la viabilidad se resentía más si se dejaban transcurrir 15 días, 1 mes, y hasta 3 meses a partir del momento de la descongelación. Una posible explicación a que las células tras 2 días de la descongelación sean más resistentes al estrés oxidativo, puede estar provocado por la presencia de DMSO, cuya capacidad antioxidante ha sido descrita por diversos autores (Kashino *et al.*, 2010; Man *et al.*, 2014).

## **V.5 APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO EN TERAPIA CELULAR**

En las terapias celulares es importante contar con las técnicas de imagen *in vivo* para valorar el potencial regenerativo de las rADSCs. Son muchos los estudios realizados en los sobre las mejores rutas de administración (Li *et al.*, 2015b), la expresión de promotores (Knight *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2015), las propiedades en función de los diferentes tipos de Luciferasa (de Almeida *et al.*, 2011) y GFP (Shaner *et al.*, 2005). Los resultados que hemos obtenidos coinciden en parte con los descritos por estos autores.

En principio, hay que señalar la capacidad de transfección conseguida en nuestro laboratorio a la hora de insertar el plásmido pSIN-Dual-Luciferasa-GFP2 con la ayuda de un lentivirus. El hecho de que, aproximadamente, un 70% de células sean GFP<sup>+</sup> significa que

gran parte de nuestra población ha sido transfectada. Por el contrario, otros autores han tenido bajos niveles de transfección en células madre de medula ósea (Wolbank *et al.*, 2007). A pesar de que la transfección ha sido efectiva, los niveles de intensidad de fluorescencia no fueron muy elevados. Otros autores realizan una purificación adicional de células transfectadas, mediante una selección adecuada de clones de resistencia a antibióticos (Aswendt *et al.*, 2013; Reekmans *et al.*, 2013), separación mediante FACS (Cormack *et al.*, 1996), o incluso, utilización de animales transgénicos, que ya tienen incorporados en su genoma los genes de las proteínas de seguimiento (Coyne *et al.*, 2006; Zangi *et al.*, 2009). Esta baja intensidad de fluorescencia puede ser uno de los motivos por el cual no se consigue visualizar directamente las células GFP<sup>+</sup> tras la fijación del tejido. Ha sido descrito que GFP es muy sensible al protocolo de fijación (Shaner *et al.*, 2005; Jockusch and Eberhard, 2007; Patterson, 2007), a menos que esté fuertemente expresada y altamente localizada (Billinton and Knight, 2001), siendo necesario el uso de mutantes derivados de GFP, como eGFP (enhanced GFP), que es 35 veces más brillante (Zhang *et al.*, 1996). Sin embargo, a pesar de usar eGFP, la problemática de visualizar proteínas fluorescentes sigue existiendo (Lin *et al.*, 2013).

La expresión del promotor asociado es otro parámetro esencial, pues dependiendo del tipo celular, un promotor puede expresarse en mayor o menor cantidad (Coyne *et al.*, 2006; Swenson *et al.*, 2007; Ozdemir *et al.*, 2012), efecto que se magnifica en las células eucariotas, donde los promotores se expresan en menor cantidad (Billinton and Knight, 2001). La influencia de los promotores en la expresión de GFP, y su efecto en la señal fluorescente, se puede ver claramente en el estudio llevado a cabo por Mao *et al.*, (2015). En este estudio, usando diferentes promotores, se observaban diferencias apreciables en la intensidad fluorescente según se utilizara el promotor SFFV, utilizado en nuestro caso como promotor para Luciferasa, o pUBIQ usado para GFP, siendo este el que menos intensidad de fluorescencia presentaba. Además de este hecho, Knight *et al.*, (2010), demuestran que SFFV es mejor promotor que pUBIQ para la expresión de GFP.

Aunque todos estos argumentos parecen ir en contra de la idoneidad de usar SFFV y UBIQ como promotores de Luc y GFP, respectivamente, Swenson *et al.*, (2007) demuestran que niveles altos de expresión de proteínas transfectadas producen efectos tóxicos en la célula. Consecuentemente, hay que llegar a un equilibrio entre las ventajas de que se den expresiones altas de las proteínas de seguimiento y el efecto tóxico. En nuestro caso, la baja expresión de los promotores de GFP y Luc podemos suplirla con los estudios inmunológicos

realizados *in vitro* y *ex vivo*, usando técnicas inmunofluorescentes e inmunohistoquímicas. En cuanto al seguimiento realizado *in vivo* mediante técnicas de bioluminiscencia, desconocemos si el promotor SFFV afecta sustancialmente la expresión de Luc. Los resultados evidencian que la señal luminosa es intensa, al menos durante los primeros días pero, al disminuir el número de células, la señal se pierde rápidamente. Este fenómeno no sólo podría explicarse en base al promotor asociado, sino que intervendrían diversos factores.

Cuando realizamos el implante, en la zona ventral de las patas, la intensidad luminiscente es mayor y se detecta durante más tiempo, que cuando las células se implantan en el SNC, en este caso en ventrículo derecho (Figuras 58 y 59). En ambos casos, la intensidad de la señal tras 24 h disminuye drásticamente. En los días sucesivos, la señal disminuye más lentamente en las patas. Estos resultados sugieren que las primeras 24 h tras el implante son cruciales para la supervivencia celular, pues la alta disminución de la intensidad va supuestamente asociada a una mayor muerte celular. Si trasplantamos menos células en otras regiones del SNC, como por ejemplo en hipocampo (HP) y sustancia nigra (SN), la señal se hace aun más débil, desapareciendo en pocos días (Figura 60). Se ha publicado que el implante podría “sobrevivir” más tiempo si se inyecta mayor número de células. Con el mismo número de células trasplantadas se ha conseguido más señal en animales inmunocompetentes con selección previa de clones, solo durante 14 días (Reekmans *et al.*, 2013) o con menor número de células implantadas pero en animales inmunodeprimidos, o animales jóvenes con sistema inmune inmaduro (Aswendt *et al.*, 2013). También, se han obtenido resultados similares a los nuestros cuando el implante se realizaba de manera heteróloga (Li *et al.*, 2015b). No obstante, nuestro objetivo es ver para qué cantidad mínima, y hasta que profundidad en el implante, podemos tener señal para realizar un seguimiento, ya que cada centímetro de profundidad produce una disminución en la señal de diez veces (de Almeida *et al.*, 2011). Tratándose de SNC la trasmisión es aún menor (Lin *et al.*, 2013), siendo más alta en piel (Zhao *et al.*, 2005). Implantar un mayor número de células para obtener señal a mayores profundidades o durante más tiempo sería contraproducente a la hora de realizar una terapia celular, pues la respuesta inflamatoria sería también mayor (Coyne *et al.*, 2006). Diversos estudios sugieren que la respuesta inmunitaria creada tras el implante puede destruir la mayoría de las células (Coyne *et al.*, 2006; Poncelet *et al.*, 2007; Zangi *et al.*, 2009), no llegando a ser suficientes para ser detectadas por quimioluminiscencia. En ese caso, se tendrían que usar técnicas inmunológicas para continuar el seguimiento de las células que sobreviven y maduran (Coyne *et al.*, 2006).

Cuando se realiza el implante a través de una vía sistémica, no hemos tenido tanto éxito como el logrado por Zangi *et al.*, (2009), en cuanto a la duración de la señal tras administrar las células por vía i.v. e i.h. Nuestros resultados muestran que existe una “difusión” de las células tras inyección sistémica, apareciendo en diferentes lugares de la cola del animal (Figura 61) y en diferente localización del área abdominal, tras la inyección i.h. (Figura 62). Si la señal luminosa deja de detectarse no necesariamente significa que todas las células hayan muerto; puede ocurrir que las que han sobrevivido no son lo suficientemente numerosas para ser detectadas por bioluminiscencia. Este hecho lo podemos corroborar porque aún existen células Luc<sup>+</sup>, incluso hasta 6 meses después de haber sido implantadas, y esto a pesar de existir evidencias de que los genes que se incorporan en el genoma mediante lentivirus pueden sufrir una disminución de la expresión cuando se producen fenómenos de migración o diferenciación, tanto *in vivo* como *in vitro* (Vroemen *et al.*, 2005). Sin embargo, la cantidad de células que sobreviven y maduran sólo pueden ser detectadas mediante técnicas inmunológicas.

En un principio, el motivo por el cual se aplicaron técnicas inmunológicas tras la desaparición de la señal era ver cómo el implante podría modificar el tejido huésped. Es por ello por lo que en una primera determinación usamos anticuerpos anti- Luc y NeuN, siendo éste último un marcador nuclear de neuronas presente en todas las células del huésped. Los resultados muestran que muchas células Luc<sup>+</sup> presentaron NeuN en sus núcleos (Figuras 65-67). Si hubiéramos usado otro marcador distinto de Luc, como por ejemplo BrdU o BBZ, se podría pensar que se trataba de fenómenos de fusión, descritos por varios autores como propiedades inherentes las células madre (Coyne *et al.*, 2006; Kemp *et al.*, 2011). Pero Luc es constitutivo en las rADSCs, integrado en su genoma y requiere de la maquinaria celular para expresarse.

Cuando realizamos las inmunofluorescencias en tejido hepático utilizamos el anticuerpo ASGPR1/2 para determinar su co-localización con Luc (Figuras 70 y 71). Son diversos los autores que demuestran la diferenciación de las MSCs hasta hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Sato *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2015), pero pocos usan ASGPR1/2 como indicador de diferenciación (Sato *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2012) y los que lo hacen solo miden sus niveles mediante PCR. Pensamos que ASGPR1/2 es más específico de hepatocitos que otras proteínas usadas para determinar diferenciación, como albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, y citoqueratinas, que pueden ser constitutivas de otras células. Los resultados muestran que algunas de las células Luc<sup>+</sup> presentan el receptor ASGPR1/2, lo que es una

prueba de su expresión por parte de las rADSCs. Las imágenes obtenidas poseen una buena mejor definición que las publicadas por otros autores (Sato *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2015) para demostrar la diferenciación de hepatocitos.

Como conclusión, podemos destacar que las rADSCs son capaces de sobrevivir durante un largo período después del implante y sobrevivir a la respuesta inmunitaria generada. Además, son capaces de sobrevivir y diferenciarse. Por lo observado en nuestros experimentos, confirmando lo que han detectado otros investigadores, parece que las células madre rADSCs trasplantadas en diversas zonas anatómicas del SNC han evidenciado positividad a NeuN (marcador de proteína nuclear neuronal) y positividad a ASGPR1/2, anticuerpo específico hepático, cuando se implantaban en hígado. Quedaría por resolver si la diferenciación, determinada por la presencia de esos marcadores, aporta a las rADSCs diferenciadas la potestad de ser consideradas células neuronales, en el caso de que expresen NeuN, o células hepáticas, en caso de que expresen ASGPR1/2, o por el contrario, no poseen la funcionalidad requerida.

## **V.6 USO POTENCIAL DE LAS rADSCs COMO TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

El carácter inmunomodulador que poseen las MSCs y su capacidad para presentar fenotipo neuronal convierte a las rADSCs en candidatas para tratar enfermedades neurodegenerativas. Puesto que ha sido muy estudiada en nuestro laboratorio, nos hemos centrado en la enfermedad de Parkinson (PD), utilizando un modelo de inflamación con lipopolisacárido (LPS) (Venero *et al.*, 2013; Kavanagh *et al.*, 2014; Burguillos *et al.*, 2015). La neurotoxicidad dopaminérgica por LPS es dependiente de la presencia de la microglía (Burguillos *et al.*, 2015), siendo la sustancia nigra (SN) especialmente sensible al estímulo inflamatorio, ya que contiene la mayor densidad de células microgliales de todo el SNC (Lawson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2000).

Las MSCs pueden tanto estimular el sistema inmune como provocar la inmunosupresión (Yagi *et al.*, 2010; English and Mahon, 2011; Dazzi *et al.*, 2012). Hay quien sostiene que son células inmunoprivilegiadas, porque su presencia no causa reacción antigénica por parte del sistema inmunitario, convirtiendo a estas células en aptas para trasplantes (Yagi *et al.*, 2010). Sin embargo, existen evidencias de que no son tan privilegiadas como parecen y que inducen una respuesta inmunitaria, disminuyendo la supervivencia de las MSC trasplantadas (Eliopoulos *et al.*, 2005; Coyne *et al.*, 2006). Si bien

estos antecedentes pueden propiciar el uso de las ADSCs en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, y otros autores lo han intentado con diversas estrategias, los resultados han sido ambiguos, pues hay quienes han conseguido una neuroprotección, tanto *in vivo* como *in vitro* (Wang *et al.*, 2010a; Stemberger *et al.*, 2011; Ooi *et al.*, 2015), y quienes, por el contrario, no lo han observado (Camp *et al.*, 2009; Schwerk *et al.*, 2015).

En nuestro caso, tras un período de 4-6 meses después de los tratamientos, se observa que la microglía sigue presente, y en gran medida, en el hemisferio tratado con LPS, pero con menos intensidad cuando el LPS se inyecta conjuntamente con las rADSC (Figura 72), ya que parece que la presencia de ADSCs ha disminuido el número de células Iba1<sup>+</sup>. Sin embargo, no conseguimos demostrar, con las imágenes de microscopio confocal, si la co-localización entre Luc e Iba1 se debe a una diferenciación de las rADSCs con fenotipo macrófago o microglial, o se trata de microglía que haya podido degradar parte de las células rADSC-GFP-Luc<sup>+</sup>. Inclusive, de si se trata realmente de células o agregados, ya que no se observa claramente en esas zonas de co-localización un núcleo bien definido (Figura 73).

Cuando llevamos a cabo las mismas observaciones para TH y Luc, en esta ocasión sí existía una co-localización entre cuerpos celulares y, a diferencia de lo anterior entre Iba1 y Luc, podíamos observar con claridad, en algunas de las co-localizaciones de ambas proteínas, un núcleo bien definido (Figura 74). No podemos afirmar con certeza si la co-localización se debía a una diferenciación completa de las rADSCs hasta células dopaminérgicas, o solamente expresaban TH. Si bien existe la posibilidad de transformar MSCs a neuronas dopaminérgicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Trzaska and Rameshwar, 2011; Wang *et al.*, 2013), puede deberse a fenómenos de fusión entre una célula ADSC y otra TH<sup>+</sup> (Ferrand *et al.*, 2011; Kemp *et al.*, 2011). Aun así, quedaría por resolver cómo se observan células TH<sup>+</sup> en una localización alejada de SN, rodeada por células que sólo expresan Luc y por otras que co-localizan TH y Luc (Figuras 74 y 75). Una posible explicación sería que las rADSCs, además de tener la capacidad de expresar TH, liberasen factores neurotróficos que puedan estar ejerciendo un efecto quimioatractivo, provocando que células TH<sup>+</sup> migren hasta esa zona más alejada de la SN (Jin *et al.*, 2008; Donega *et al.*, 2014).

Para saber si los resultados observados pueden ser de utilidad en una terapia celular para la enfermedad de Parkinson, debemos realizar un análisis estereológico para ver si el efecto observado puede proteger de la neurodegeneración dopaminérgica tras el tratamiento con LPS. Los resultados mostrados en las imágenes de microscopía anticipan los que se

obtiene mediante el análisis estereológico de OX-6, donde apenas existe activación microglial en el grupo control, y muy poca en el grupo de 6-OHDA, resultados ya esperados (Espinosa-Oliva *et al.*, 2014). Por el contrario, aparece una activación muy intensa en los animales tratados con LPS, donde el grupo tratado con rADSCs presentan menores niveles de células OX-6 (48,4% menos) (Figura 76). En cuanto al análisis estereológico realizado para TH, el número de neuronas es muy bajo en los grupos 6-OHDA y LPS, mientras que los animales tratados con rADSCs tienen un 28% más de neuronas que en el grupo de LPS (Figura 77).

Por lo tanto, podemos afirmar que las células implantadas provocan una disminución en la activación microglial después de 4 meses, protegiendo de la neurodegeneración a las células dopaminérgicas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Schwerk *et al.*, (2015) y Wang *et al.*, (2013), previa diferenciación de MSCs, y no obteniendo diferencias significativas estadísticamente para MSC, para un modelo de Parkinson basado en 6-OHDA. Otros autores no han obtenido una mejora de neuronas TH en sus respectivos modelos (Eliopoulos *et al.*, 2005; Neirinckx *et al.*, 2013). Las MSCs son células madre que ofrecen en su mayoría descendencia de células del tejido conectivo, tejido que está en primera línea cuando se produce un daño por agentes externos. Si se trata de microorganismos, lo que interesa es que la respuesta inmune sea estimulada. Por lo tanto, cuando existe presencia de PAMPs o activación de los receptores TLR3 y TLR4, las MSCs promueven la estimulación del sistema inmune (Liotta *et al.*, 2008; English and Mahon, 2011; Thakur *et al.*, 2013; Ulrich *et al.*, 2015). Por el contrario, las MSCs en ausencia de PAMPs (English and Mahon, 2011), o en presencia de citoquinas como IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$ , producen inmunosupresión en linfocitos T, células NK, células DC, y otras, liberando incluso citoquinas como PGE, TGF (Yagi *et al.*, 2010; Dazzi *et al.*, 2012), galectina-1, SDF-1 $\alpha$  (Wang *et al.*, 2010a; Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2015), y TSG6 (Liu *et al.*, 2014), que presentan un efecto inhibitor sobre la microglía (Gieseke *et al.*, 2010; Starossom *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). Hipotéticamente, cuando las MSCs están expuestas a un daño, tal como una infección bacteriana, las moléculas MCH-II facilitan la presentación de antígenos bacterianos, lo que conduce a la activación de células T. Estas últimas células producen IFN- $\gamma$ . Si los niveles de IFN- $\gamma$  son altos, se induce una disminución de la expresión de MCH-II en las MSCs, evitando así una sobreexpresión de la respuesta inmune (Chan *et al.*, 2006; Yagi *et al.*, 2010; English and Mahon, 2011). Si esta hipótesis resultara correcta, las MSCs podrían ser particularmente eficaces en la supresión de la inflamación crónica asociada con la autoinmunidad, en los cuales los niveles de IFN- $\gamma$  son elevados, sin perjudicar las respuestas inflamatorias mediante la presentación de antígenos a

través de MHC-II esenciales para la defensa antimicrobiana (English and Mahon, 2011; Eggenhofer *et al.*, 2014).

No obstante, hay que tener en cuenta que, si por una lado las células activan la respuesta inmune, y también la suprimen, dependerá de varios factores que se produzca una neuroprotección eficaz (Levin *et al.*, 2014). Existen, sin duda, variables a tener en cuenta como las alteraciones que sufran las rADSCs en cultivo y posteriores manipulaciones diversas *in vitro* (Eggenhofer *et al.*, 2014; Levin *et al.*, 2014), una elevada activación de los receptores TLR3 y TLR4, por excesiva dosis de LPS (8  $\mu$ g), provocando la estimulación del sistema inmune (Liotta *et al.*, 2008; English and Mahon, 2011; Thakur *et al.*, 2013; Ulrich *et al.*, 2015) y factores de activación o supresión microglial que se produzcan tras el implante (Levin *et al.*, 2014). Todas estas contingencias van a determinar el efecto clínico. Una explicación plausible del comportamiento dual ofrecido por las MSCs frente a los estímulos inflamatorio es la descrita por Levin *et al.*, (2014), quienes explican la posibilidad de que existan poblaciones de MSCs *in vivo* con diferente respuesta a la activación de TLR, con lo que se conseguiría crear respuestas divergentes. Por un lado, algunas MSCs regenerarían el tejido dañado y otras permanecerían quiescentes, para activar luego los procesos de auto-renovación, manteniéndose reservas de MSCs en los tejidos, sin que disminuyan. El reto futuro reside en averiguar a través de qué acciones o mecanismos se pueden controlar dichas variables o circunstancias adversas para que estos efectos neuroprotectores de las células madre pasen de virtuales a reales, seguros y confiables (Gieseke *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010a; Yagi *et al.*, 2010;; English and Mahon, 2011; Stemberger *et al.*, 2011; Dazzi *et al.*, 2012; Starossom *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Ooi *et al.*, 2015).

---

**VI. CONCLUDING REMARKS**  
**(ENGLISH)**



During the course of this thesis, we have made the following contributions:

1. We have established a protocol to obtain mesenchymal stem cells (MSCs) from adipose tissue that meet the criteria of International Society for Cell Therapy:
  - a) MSCs must be plastic-adherent when maintained in standard culture conditions
  - b) MSCs must express CD105, CD73 and CD90, and lack expression of CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha or CD19 and HLA-DR surface molecules.
  - c) MSCs must differentiate to osteoblasts, adipocytes and chondroblasts *in vitro*.

The method is based on immunomagnetic isolation with microbeads.

2. Several biochemical pathways were studied in MSCs. Our results show an increase of eEF2, but a decrease of AMPK $\alpha$  and SIRT1 in humans. Similar effects were observed in rats. These results suggest that older ADSCs become more active to regenerate the aging effects in tissues, meanwhile younger ADSCs remain in quiescent state. Anyway there are variability between the samples, for that reason these results will be considered as reference.

3. In regard to oxidative stress we cannot establish a relationship between age and damage by oxidants. However, older ADSCs are more sensitive than younger when the damage was caused by menadione. Nonetheless, older cells were as sensitive as younger cells when the damage was produced by cumene hydroperoxide.

4. Pluripotency factors (Nanog and Sox2) diminish with age both in rADSCs and hADSCs. This lack of stemness is correlated with a lower capability of adipogenic and osteogenic differentiation. However, in humans the adipogenic differentiation increases with age in a linear relationship way. It is worthy to note that age range of hADSC donor (25-48 years) was narrower than the age range used in rats (9 weeks - 24 months).

5. Cumene hydroperoxide treatment *in vivo* leads to decrease of eEF2 and AMPK levels, but an increase of SIRT1 in liver, probably as a part of an antioxidant response. This oxidative stress affects the levels of pluripotency factors Nanog and Sox2 (diminishing Nanog and increasing Sox2). This cellular state leads to an early differentiation, mainly into the adipogenic state over the osteogenic one, probably due to AMPK inhibition, which promotes osteogenic differentiation. This physiological state is similar to that found in aging, where there are less stem cells, more adipocytes and less osteoblast.

6. Using gene reporters to track cells after engraftment is a useful tool, but immune response can destroy most of cells engrafted, avoiding further cell tracking.

However, not all cells die and some of them survive as well as mature, migrate and differentiate, even six months after engraftment.

7. Four months after engraftment, rADSC have shown, in some cases, expression of neurogenic marker like NeuN, TH, and hepatic markers like ASGPR1/2.

8. rADSC diminishes microglial activation, which protect to dopaminergic neurons from a degenerative process in rat LPS model of Parkinson Disease.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abbott, C. M., and Proud, C. G. (2004). 'Translation factors: in sickness and in health'. *Trends Biochem. Sci.* 29:25-31
- Adams, M., Montague, C. T., Prins, J. B., Holder, J. C., Smith, S. A., Sanders, L., Digby, J. E., Sewter, C. P., Lazar, M. A., Chatterjee, V. K., and O'Rahilly, S. (1997). 'Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation.' *J. Clin. Invest.* 100(12), 3149-3153.
- Adams, V., Challen, G. A., Zuba-Surma, E., Ulrich, H., Vereb, G., and Tárnok, A. (2009). 'Where new approaches can stem from: focus on stem cell identification'. *Cytometry A* 75(1), 1-3.
- Agorogiannis, G. I., Alexaki, V. I., Castana, O., and Kymionis, G. D. (2012). 'Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect'. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 250(3), 455-457.
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., and de Crombrughe, B. (2002). 'The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6'. *Genes Dev.* 16(21), 2813-2828.
- Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U. I., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., Kadowaki, T., and Kawaguchi, H. (2004). 'PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors'. *J. Clin. Invest.* 113(6), 846-855.
- Álvarez-Viejo, M., Menéndez-Menéndez, Y., and Otero-Hernández, J. (2015). 'CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture'. *World J. Stem Cells* 7(2), 470-476.
- Antonenas, V., Shaw, P. J., and Bradstock, K. F. (2004). 'Infusion of unwashed umbilical cord blood stem cells after thawing for allogeneic transplantation'. *Bone Marrow Transplant* 34(8), 739.
- Areman, E. M., Sacher, R. A., and Deeg, H. J. (1990). 'Cryopreservation and storage of human bone marrow: a survey of current practices'. *Prog. Clin. Biol. Res.* 333, 523-9.
- Argüelles, S., Camandola, S., Cutler, R. G., Ayala, A., and Mattson, M. P. (2014). 'Elongation factor 2 diphthamide is critical for translation of two IRES-dependent protein targets, XIAP and FGF2, under oxidative stress conditions'. *Free Radic. Biol. Med.* 67, 131-138.
- Argüelles, S., Camandola, S., Hutchison, E. R., Cutler, R. G., Ayala, A., and Mattson, M. P. (2013). 'Molecular control of the amount, subcellular location, and activity state of translation elongation factor 2 in neurons experiencing stress'. *Free Radic. Biol. Med.* 61, 61-71.
- Argüelles, S., Cano, M., Machado, A., and Ayala, A. (2011). 'Effect of aging and oxidative stress on elongation factor-2 in hypothalamus and hypophysis'. *Mech. Ageing Dev.* 132(1-2), 55-64.
- Argüelles, S., Machado, A., and Ayala, A. (2006a). 'In vitro' effect of lipid peroxidation metabolites on elongation factor-2'. *Biochim. Biophys. Acta* 1760(3), 445-52.
- Argüelles, S., Machado, A., and Ayala, A. (2009). 'Adduct formation of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde with elongation factor-2 in vitro and in vivo'. *Free Radic. Biol. Med.* 47(3), 324-330.
- Argüelles, S., Machado, M. J., Ayala, A., Machado, A., and Hervías, B. (2006b). 'Correlation between circulating biomarkers of oxidative stress of maternal and umbilical cord blood at birth'. *Free Radic. Res.* 40(6), 565-570.

- Aswendt, M., Adamczak, J., Couillard-Despres, S., and Hoehn, M. (2013). 'Boosting bioluminescence neuroimaging: an optimized protocol for brain studies'. *PLoS One* 8(2), e55662.
- Atashi, F., Modarressi, A., and Pepper, M. S. (2015). 'The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review'. *Stem Cells Dev.* 24(10), 1150-1163.
- Auley, M. T., Mooney, K. M., Angell, P. J., and Wilkinson, S. J. (2015). 'Mathematical modelling of metabolic regulation in aging'. *Metabolites* 5(2), 232-251.
- Austin, S., and St-Pierre, J. (2012). 'PGC1 $\alpha$  and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders'. *J. Cell Sci.* 125(Pt 21), 4963-4971.
- Ayala, A., Munoz, M. F., and Arguelles, S. (2014). 'Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal'. *Oxid. Med. and Cell. Longev.* 360-438.
- Ayala, A., Parrado, J., Bougria, M. and Machado, A. (1996) 'Effect of oxidative stress, produced by cumene hydroperoxide, on the various steps of protein synthesis. Modifications of elongation factor-2', *J. Biol. Chem.*, 271(38), pp. 23105-23110.
- Bagattin, A., Hugendubler, L., and Mueller, E. (2010). 'Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  promotes peroxisomal remodeling and biogenesis'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(47),. 20376-20381.
- Baglioni, S., Francalanci, M., Squecco, R., Lombardi, A., Cantini, G., Angeli, R., Gelmini, S., Guasti, D., Benvenuti, S., Annunziato, F., Bani, D., Liotta, F., Francini, F., Perigli, G., Serio, M., and Luconi, M. (2009). 'Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue'. *FASEB J.* 23(10),. 3494-3505.
- Bailey, A. M., Kapur, S., and Katz, A. J. (2010). 'Characterization of adipose-derived stem cells: an update'. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 5(2), 95-102.
- Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B., and Ashammakhi, N. (2008). 'Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine'. *J. Tissue Eng. Regen Med.* 2(4), 169-183.
- Bakken, A. M., Bruserud, O., and Abrahamsen, J. F. (2003). 'No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5% or 10% dimethyl sulfoxide'. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 12(3), 351-358.
- Banerjee, C., Javed, A., Choi, J. Y., Green, J., Rosen, V., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., and Stein, G. S. (2001). 'Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype'. *Endocrinology* 142(9), 4026-4039.
- Baron, R., and Kneissel, M. (2013). 'WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments'. *Nat. Med.* 19(2), 179-192.
- Basu-Roy, U., Ambrosetti, D., Favaro, R., Nicolis, S. K., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2010). 'The transcription factor Sox2 is required for osteoblast self-renewal'. *Cell Death Differ.* 17(8), 1345-1353.
- Bennett, C. N., Ouyang, H., Ma, Y. L., Zeng, Q., Gerin, I., Sousa, K. M., Lane, T. F., Krishnan, V., Hankenson, K. D., and MacDougald, O. A. (2007). 'Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation'. *J. Bone Miner. Res.* 22(12), 1924-1932.
- Bennett, C. N., Ross, S. E., Longo, K. A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K. W., Harrison, S. D., and MacDougald, O. A. (2002). 'Regulation of Wnt signaling during adipogenesis'. *J. Biol Chem.* 277(34), 30998-301004.

- Billinton, N., and Knight, A. W. (2001). 'Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence'. *Anal. Biochem.* 291(2), 175-197.
- Bjorklund, L. M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I. Y., McNaught, K. S., Brownell, A. L., Jenkins, B. G., Wahlestedt, C., Kim, K. S., and Isacson, O. (2002). 'Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(4), 2344-2349.
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., and Nikbin, B. (2006). 'Aging of mesenchymal stem cell in vitro'. *BMC Cell. Biol.* 7, 14.
- Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N., and Burova, E. (2014). 'Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells'. *Aging (Albany NY)* 6(6), 481-495.
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., and Gimble, J. M. (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 Society for Cellular Therapy (ISCT)'. *Cytotherapy* 15(6), 641-648.
- Brandl, A., Meyer, M., Bechmann, V., Nerlich, M., and Angele, P. (2011). 'Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells'. *Exp. Cell Res.* 317(11), 1541-1547.
- Brown, S. A., Levi, B., Lequeux, C., Lequex, C., Wong, V. W., Mojallal, A., and Longaker, M. T. (2010). 'Basic science review on adipose tissue for clinicians'. *Plast. Reconstr. Surg.* 126(6), 1936-1946.
- Browne, G. J., and Proud, C. G. (2002). 'Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells'. *Eur. J. Biochem.* 269:5360-5368.
- Bruder, S. P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S. E. (1997). 'Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation'. *J. Cell. Biochem.* 64(2), 278-294.
- Bunnell, B. A., Flaatt, M., Gagliardi, C., Patel, B., and Ripoll, C. (2008). 'Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation'. *Methods* 45(2), 115-120.
- Burguillos, M. A., Deierborg, T., Kavanagh, E., Persson, A., Hajji, N., Garcia-Quintanilla, A., Cano, J., Brundin, P., Englund, E., Venero, J. L., and Joseph, B. (2011a) 'Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity'. *Nature* 472(7343), 319-324.
- Burguillos, M. A., Hajji, N., Englund, E., Persson, A., Cenci, A. M., Machado, A., Cano, J., Joseph, B., and Venero, J. L. (2011b). 'Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus: evidence in Parkinson's disease patients'. *Neurobiol. Dis.* 41(1), 177-188.
- Burguillos, M. A., Svensson, M., Schulte, T., Boza-Serrano, A., Garcia-Quintanilla, A., Kavanagh, E., Santiago, M., Viceconte, N., Oliva-Martin, M. J., Osman, A. M., Salomonsson, E., Amar, L., Persson, A., Blomgren, K., Achour, A., Englund, E., Leffler, H., Venero, J. L., Joseph, B., and Deierborg, T. (2015). 'Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation'. *Cell Rep.* 10,(9),1626-1638.
- Burns, T. C., Verfaillie, C. M., and Low, W. C. (2009). 'Stem cells for ischemic brain injury: a critical review'. *J. Comp. Neurol.* 515(1), 125-144.

- Burova, E., Borodkina, A., Shatrova, A., and Nikolsky, N. (2013). 'Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium'. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013, 474931.
- Cai, L., Johnstone, B. H., Cook, T. G., Tan, J., Fishbein, M. C., Chen, P. S., and March, K. L. (2009). 'IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function'. *Stem Cells* 27(1), 230-237.
- Camp, D. M., Loeffler, D. A., Farrah, D. M., Borneman, J. N., and LeWitt, P. A. (2009). 'Cellular immune response to intrastrially implanted allogeneic bone marrow stromal cells in a rat model of Parkinson's disease'. *J. Neuroinflammation* 6, 17.
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). 'AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity'. *Nature* 458(7241), 1056-1060.
- Caplan, A. I. (1991). 'Mesenchymal stem cells'. *J. Ortho. Res.* 9(5), 641-650.
- Carelli, S., Messaggio, F., Canazza, A., Hebda, D. M., Caremoli, F., Latorre, E., Grimoldi, M. G., Colli, M., Bulfamante, G., Tremolada, C., Di Giulio, A. M., and Gorio, A. (2014). 'Characteristics and Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Micro-fragmented Adipose Tissue'. *Cell. Transplant.* 24(7):1233-1252.
- Carling, D., Sanders, M. J., and Woods, A. (2008). 'The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases'. *Int. J. Obes. (Lond)* 32 Suppl 4, S55-59.
- Carrière, A., Carmona, M. C., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Wenger, R. H., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2004). 'Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect'. *J. Biol. Chem.* 279(39), 40462-40469.
- Carson, C. T., Aigner, S., and Gage, F. H. (2006). 'Stem cells: the good, bad and barely in control'. *Nat. Med.* 12(11), 1237-1238.
- Casteilla, L., Planat-Benard, V., Bourin, P., Laharrague, P., and Cousin, B. (2011). 'Use of adipose tissue in regenerative medicine'. *Transfus. Clin. Biol.* 18(2), 124-128.
- Catalina, P., Montes, R., Ligeró, G., Sanchez, L., de la Cueva, T., Bueno, C., Leone, P. E., and Menendez, P. (2008). 'Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties?'. *Mol. Cancer*, 7, 76.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). 'Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells'. *Cell* 113(5), 643-655.
- Chan, F. K., Moriwaki, K., and De Rosa, M. J. (2013). 'Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity'. *Methods Mol. Biol.* 979, 65-70.
- Chan, J. L., Tang, K. C., Patel, A. P., Bonilla, L. M., Pierobon, N., Ponzio, N. M. and Rameshwar, P. (2006) 'Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma'. *Blood*, 107(12), 4817-4824.
- Chang, J., Liu, F., Lee, M., Wu, B., Ting, K., Zara, J. N., Soo, C., Al Hezaimi, K., Zou, W., Chen, X., Mooney, D. J., and Wang, C. Y. (2013). 'NF- $\kappa$ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting  $\beta$ -catenin degradation'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(23), 9469-9474.
- Chang, T. C., Hsu, M. F., and Wu, K. K. (2015). 'High glucose induces bone marrow-derived mesenchymal stem cell senescence by upregulating autophagy'. *PLoS One* 10(5), e0126537.

- Charrière, G., Cousin, B., Arnaud, E., André, M., Bacou, F., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2003). 'Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity'. *J. Biol. Chem.* 278(11), 9850-9855.
- Chaudhary, P., Sharma, R., Sharma, A., Vatsyayan, R., Yadav, S., Singhal, S. S., Rauniyar, N., Prokai, L., Awasthi, S., and Awasthi, Y. C. (2010). 'Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling'. *Biochemistry* 49(29), 6263-6275.
- Chen, H., Liu, X., Cao, J., Zhang, L., Hu, X., and Wang, J. (2014a). 'Role of SIRT1 and AMPK in mesenchymal stem cells differentiation'. *Ageing Res. Rev.* 13, 55-64.
- Chen, X., Xu, H., Wan, C., McCaigue, M., and Li, G. (2006). 'Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells'. *Stem Cells* 24(9), 2052-2059.
- Chen, Y. T., Chiang, H. J., Chen, C. H., Sung, P. H., Lee, F. Y., Tsai, T. H., Chang, C. L., Chen, H. H., Sun, C. K., Leu, S., Chang, H. W., Yang, C. C., and Yip, H. K. (2014b). 'Melatonin treatment further improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute interstitial cystitis in rat'. *J. Pineal Res.* 57(3), 248-261.
- Chen, Y. T., Sun, C. K., Lin, Y. C., Chang, L. T., Chen, Y. L., Tsai, T. H., Chung, S. Y., Chua, S., Kao, Y. H., Yen, C. H., Shao, P. L., Chang, K. C., Leu, S., and Yip, H. K. (2011). 'Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction'. *J. Transl. Med.* 9, 51.
- Clément-Lacroix, P., Ai, M., Morvan, F., Roman-Roman, S., Vayssière, B., Belleville, C., Estrera, K., Warman, M. L., Baron, R., and Rawadi, G. (2005). 'Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(48), 17406-17411.
- Cohen-Kfir, E., Artsi, H., Levin, A., Abramowitz, E., Bajayo, A., Gurt, I., Zhong, L., D'Urso, A., Toiber, D., Mostoslavsky, R., and Dresner-Pollak, R. (2011). 'Sirt1 is a regulator of bone mass and a repressor of Sost encoding for sclerostin, a bone formation inhibitor'. *Endocrinology* 152(12), 4514-4524.
- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M., and Prockop, D. J. (2000). 'Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(7), 3213-3218.
- Connor, W., and Ashwood-Smith, M. J. (1973). 'Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanisms'. *Cryobiology* 10(6), 488-496.
- Constantin, G., Marconi, S., Rossi, B., Angiari, S., Calderan, L., Anghileri, E., Gini, B., Bach, S. D., Martinello, M., Bifari, F., Galiè, M., Turano, E., Budui, S., Sbarbati, A., Krampera, M., and Bonetti, B. (2009). 'Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis'. *Stem Cells* 27(10), pp. 2624-2435.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) 'FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)', *Gene*, 173(1 Spec No), 33-38.
- Corselli, M., Chen, C. W., Sun, B., Yap, S., Rubin, J. P. and Péault, B. (2012) 'The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells', *Stem Cells Dev*, 21(8), 1299-1308.
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A. and Cory, J. G. (1991) 'Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture', *Cancer Commun.* 3(7), 207-212.
- Coyne, T. M., Marcus, A. J., Woodbury, D., and Black, I. B. (2006). 'Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia'. *Stem Cells* 24(11), 2483-2492.
- Criddle, D. N., Gillies, S., Baumgartner-Wilson, H. K., Jaffar, M., Chinje, E. C., Passmore, S., Chvanov, M., Barrow, S., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V., Sutton, R., and

- Petersen, O. H. (2006). 'Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells'. *J. Biol. Chem.* 281(52), 40485-40492.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badyrak, S., Buhring, H. J., Jacobino, J. P., Lazzari, L., Huard, J., and Péault, B. (2008). 'A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs'. *Cell Stem Cell* 3(3), 301-313.
- Cui, X. D., Gao, D. Y., Fink, B. F., Vasconez, H. C., and Pu, L. L. (2007). 'Cryopreservation of human adipose tissues'. *Cryobiology* 55(3), 269-278.
- Cui, Y., Niziolek, P. J., MacDonald, B. T., Zylstra, C. R., Alenina, N., Robinson, D. R., Zhong, Z., Matthes, S., Jacobsen, C. M., Conlon, R. A., Brommage, R., Liu, Q., Mseeh, F., Powell, D. R., Yang, Q. M., Zambrowicz, B., Gerrits, H., Gossen, J. A., He, X., Bader, M., Williams, B. O., Warman, M. L., and Robling, A. G. (2011). 'Lrp5 functions in bone to regulate bone mass'. *Nat. Med.* 17(6), 684-691.
- David, N. A. (1972). 'The pharmacology of dimethyl sulfoxide'. *Annu. Rev. Pharmacol.* 12, 353-374.
- Davies, O. G., Cooper, P. R., Shelton, R. M., Smith, A. J., and Scheven, B. A. (2015). 'Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation'. *J. Tissue Eng.* (6), 1-10.
- Dazzi, F., Lopes, L., and Weng, L. (2012). 'Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'?'. *Immunology* 137(3), 206-213.
- de Almeida, P. E., van Rappard, J. R., and Wu, J. C. (2011). 'In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function'. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301(3), H663-671.
- de Lima Prata, K., de Santis, G. C., Orellana, M. D., Palma, P. V., Brassesco, M. S., and Covas, D. T. (2012). 'Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions'. *Cytotherapy* 14(6), 694-700.
- de Pablos, R. M., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Sarmiento, M., Muñoz, M. F., Machado, A., and Venero, J. L. (2014). 'Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation'. *J. Neuroinflammation* 11, 34.
- de Pablos, R. M., Herrera, A. J., Villarán, R. F., Cano, J., and Machado, A. (2005). 'Dopamine-dependent neurotoxicity of lipopolysaccharide in substantia nigra'. *FASEB J.* 19(3), 407-409.
- de Souza-Sombrio, P., Ceolín de Bona, J., and Resende, S. (2004). 'Thermodynamical viability of the reactions of DMSO with OH, O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> atmospheric oxidants and test of the IB extrapolation method'. *Chem. and Phys. Lett.* 397 (1-3), 144-147.
- de Witte, T., Hoogenhout, J., de Pauw, B., Holdrinet, R., Janssen, J., Wessels, J., van Daal, W., Hustinx, T., and Haanen, C. (1986). 'Depletion of donor lymphocytes by counterflow centrifugation successfully prevents acute graft-versus-host disease in matched allogeneic marrow transplantation'. *Blood*, 67(5), 1302-1308.
- Dejosez, M., Krumenacker, J. S., Zitur, L. J., Passeri, M., Chu, L. F., Songyang, Z., Thomson, J. A., and Zwaka, T. P. (2008). 'Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells'. *Cell* 133(7), 1162-1174.
- Delgado-Cortés, M. J., Espinosa-Oliva, A. M., Sarmiento, M., Argüelles, S., Herrera, A. J., Mauriño, R., Villarán, R. F., Venero, J. L., Machado, A., and de Pablos, R. M. (2015). 'Synergistic deleterious effect of chronic stress and sodium azide in the mouse hippocampus'. *Chem, Res. Toxicol.* 28(4), 651-661.

- di Summa, P. G., Kingham, P. J., Raffoul, W., Wiberg, M., Terenghi, G., and Kalbermatten, D. F. (2010). 'Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration'. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 63(9), 1544-1552.
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Madrid, J. F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., and Martín-Vasallo, P. (2009). 'Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche'. *Histol. Histopathol.* 24(7), 909-69.
- Dimmeler, S., and Vasa-Nicotera, M. (2003). 'Aging of progenitor cells: limitation for regenerative capacity?' *J. Am. Coll. Cardiol.* 42(12), 2081-2082.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement'. *Cytotherapy* 8(4), 315-317.
- Donaldson, C., Armitage, W. J., Denning-Kendall, P. A., Nicol, A. J., Bradley, B. A., and Hows, J. M. (1996). 'Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood'. *Bone Marrow Transplant.* 18(4), 725-731.
- Donega, V., Nijboer, C. H., Braccioli, L., Slaper-Cortenbach, I., Kavelaars, A., van Bel, F., and Heijnen, C. J. (2014). 'Intranasal administration of human MSC for ischemic brain injury in the mouse: in vitro and in vivo neuroregenerative functions'. *PLoS One* 9(11), e112339.
- Dower, S. K., Qwarnstrom, E. E., and Kiss-Toth, E. (2007). 'Fluorescent protein reporter systems for single-cell measurements'. *Methods Mol. Biol.* 411, 111-9.
- Drummond, D. A., and Wilke, C. O. (2008). 'Mistranslation-induced protein misfolding as a dominant constraint on coding-sequence evolution'. *Cell* 134(2), 341-352.
- Ebrahimian, T. G., Pouzoulet, F., Squiban, C., Buard, V., André, M., Cousin, B., Gourmelon, P., Benderitter, M., Casteilla, L., and Tamarat, R. (2009). 'Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing'. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29(4), 503-510.
- Eggenhofer, E., Luk, F., Dahlke, M. H., and Hoogduijn, M. J. (2014). 'The life and fate of mesenchymal stem cells'. *Front. Immunol.* 5, 148.
- Ejiri, S. (2002). 'Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization'. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1-21.
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S., and Galipeau, J. (2005). 'Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice'. *Blood* 106(13), 4057-4065.
- English, D. (2003). 'The hope and hype of nonembryonic stem cells'. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 12(3), 253-254.
- English, K., and Mahon, B. P. (2011). 'Allogeneic mesenchymal stem cells: agents of immune modulation'. *J. Cell. Biochem.* 112(8), 1963-1968.
- Espinosa-Oliva, A. M., de Pablos, R. M., Sarmiento, M., Villarán, R. F., Carrillo-Jiménez, A., Santiago, M., Venero, J. L., Herrera, A. J., Cano, J., and Machado, A. (2014). 'Role of dopamine in the recruitment of immune cells to the nigro-striatal dopaminergic structures'. *Neurotoxicology* 41, 89-101.
- Fehrer, C., and Lepperdinger, G. (2005). 'Mesenchymal stem cell aging'. *Exp. Gerontol.* 40(12), 926-930.
- Fehrer, C., Laschober, G., and Lepperdinger, G. (2006). 'Aging of murine mesenchymal stem cells'. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1067, 235-242.
- Ferrand, J., Noël, D., Lehours, P., Prochazkova-Carlotti, M., Chambonnier, L., Ménard, A., Mégraud, F., and Varon, C. (2011). 'Human bone marrow-derived stem cells acquire

- epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells'. *PLoS One* 6(5), e19569.
- Floor, E., and Wetzel, M. G. (1998). 'Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay'. *J. Neurochem.* 70(1), 268-275.
- Foudi, A., Hochedlinger, K., Van Buren, D., Schindler, J. W., Jaenisch, R., Carey, V., and Hock, H. (2009). 'Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells'. *Nat. Biotechnol.* 27(1), 84-90.
- Franklin, J. L. (2011). 'Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis'. *Antioxid. Redox Signal.* 14(8), 1437-1448.
- Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., and Hedrick, M. H. (2006). 'Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology'. *Trends Biotechnol.* 24(4), 150-154.
- Freitas, A. L., Oliveira e Silva, M., Matsumoto, P. M., Han, S. W., and Ferreira, L. M. (2014). 'Experimental model of obtaining tissue adipose, mesenchymal stem cells isolation and distribution in surgery flaps in rats'. *Acta Cir. Bras.* 29 Suppl 2, 29-33.
- Freytag, S. O., Paielli, D. L., and Gilbert, J. D. (1994). 'Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells'. *Genes Dev.* 8(14), 1654-1663.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., and Keiliss-Borok, I. V. (1974). 'Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo'. *Transplantation* 17(4), 331-340.
- Friguet, B. (2006). 'Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress'. *FEBS Lett.* 580(12), 2910-2916.
- Fryer, H. J., Davis, G. E., Manthorpe, M., and Varon, S. (1986). 'Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer'. *Anal. Biochem.* 153(2), 262-266.
- Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejoze, M., Kyba, M., Flavell, R. A., Thomson, J. A., and Zwaka, T. P. (2008). 'Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells'. *Cell Stem Cell* 2(6), 595-601.
- Fuller, B. J. (2004). 'Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state'. *Cryo Letters* 25(6), 375-388.
- Gala, K., Burdzińska, A., Idziak, M., Makula, J., and Pączek, L. (2011). 'Characterization of bone-marrow-derived rat mesenchymal stem cells depending on donor age'. *Cell Biol. Int.* 35(10), 1055-1062.
- García-Olmo, D., García-Arranz, M., and Herreros, D. (2008). 'Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease'. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 8(9), 1417-1423.
- García-Olmo, D., Guadalajara, H., Rubio-Perez, I., Herreros, M. D., de-la-Quintana, P., and García-Arranz, M. (2015). 'Recurrent anal fistulae: limited surgery supported by stem cells'. *World J. Gastroenterol.* 21(11), 3330-3336.
- García-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, I., Pascual, J. A., Del-Valle, E., Zorrilla, J., De-La-Quintana, P., García-Arranz, M., and Pascual, M. (2009a). 'Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial'. *Dis. Colon Rectum.* 52(1), 79-86.
- García-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, M., Pascual, I., De-La-Quintana, P., Trebol, J., and García-Arranz, M. (2009b). 'Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion'. *Int. J. Colorectal Dis.* 24(1), 27-30.

- Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., and Lian, J. B. (2005). 'Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression'. *J. Biol. Chem.* 280(39), 33132-33140.
- Gebauer, F., and Hentze, M. W. (2004). 'Molecular mechanisms of translational control'. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:827-835.
- Gharibi, B., Farzadi, S., Ghuman, M., and Hughes, F. J. (2014). 'Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells'. *Stem Cells* 32(8), 2256-2266.
- Gieseke, F., Böhringer, J., Bussolari, R., Dominici, M., Handgretinger, R., and Müller, I. (2010). 'Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells'. *Blood* 116(19), 3770-3779.
- Gimble, J., and Guilak, F. (2003). 'Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential'. *Cytotherapy* 5(5), 362-369.
- Gimble, J. M., Katz, A. J., and Bunnell, B. A. (2007). 'Adipose-derived stem cells for regenerative medicine'. *Circ. Res.* 100(9), 1249-1260.
- Goh, B. C., Thirumala, S., Kilroy, G., Devireddy, R. V., and Gimble, J. M. (2007). 'Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability'. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1(4), 322-324.
- Gonda, K., Shigeura, T., Sato, T., Matsumoto, D., Suga, H., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Sato, K., Murase, S., Koshima, I., and Yoshimura, K. (2008). 'Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation'. *Plast. Reconstr. Surg.* 121(2), 401-410.
- González-Fernández, M. L., Pérez-Castrillo, S., Ordás-Fernández, P., López-González, M. E., Colaço, B., and Villar-Suárez, V. (2015). 'Study on viability and chondrogenic differentiation of cryopreserved adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for future use in regenerative medicine'. *Cryobiology* 71(2), 256-263.
- Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S.J., Fabbri, E., Navas, P., and Ferrucci, L. (2015) 'Reconsidering the role of mitochondria in aging' *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 70(11), 1334-1342.
- Goodwin, C. J., Holt, S. J., Downes, S., and Marshall, N. J. (1995). 'Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS'. *J. Immunol. Methods* 179(1), 95-103.
- Grant, A. C., Ortiz-Colòn, G., Doumit, M. E., and Buskirk, D. D. (2008). 'Optimization of in vitro conditions for bovine subcutaneous and intramuscular preadipocyte differentiation'. *J. Anim. Sci.* 86(1), 73-82.
- Gregory, C. A., Prockop, D. J., and Spees, J. L. (2005). 'Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation'. *Exp. Cell Res.* 306(2), 330-335.
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., and Gimble, J. M. (2001). 'Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells'. *J. Cell. Physiol.* 189(1), 54-63.
- Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortessidis, A., and Simmons, P. J. (2003). 'Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow'. *J. Cell. Sci.* 116(9), 1827-35.
- Grützkau, A., and Radbruch, A. (2010). 'Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years'. *Cytometry A* 77(7), 643-647.
- Guillén-Sans, R., and Guzmán-Chozas, M. (1998). The tiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition* 38(4), 315-330.

- Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., and Pakkenberg, B. (1988). 'The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis'. *APMIS* 96(10), 857-881.
- Gurtovenko, A. A., and Anwar, J. (2007). 'Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide'. *J. Phys. Chem. B* 111(35), 10453-10460.
- Guzmán-Chozas, M., Vicario, I.M., and Guillén-Sans, R. (1998). 2-Thiobarbituric acid test for lipid oxidation in food: synthesis and spectroscopic study of 2-thiobarbituric acid-malonaldehyde adduct. *J. Am. Oil Chem Soc.* 75(12), 1771-1715.
- Haasters, F., Prall, W. C., Anz, D., Bourquin, C., Pautke, C., Endres, S., Mutschler, W., Docheva, D., and Schieker, M. (2009). 'Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing'. *J. Anat.* 214(5), 759-767.
- Haberzettl, P., and Hill, B. G. (2013). 'Oxidized lipids activate autophagy in a JNK-dependent manner by stimulating the endoplasmic reticulum stress response'. *Redox Biol.* 1, 56-64.
- Halder, G., and Johnson, R. L. (2011). 'Hippo signaling: growth control and beyond'. *Development* 138(1), 9-22.
- Halme, D. G., and Kessler, D. A. (2006). 'FDA regulation of stem-cell-based therapies'. *N. Engl. J. Med.* 355(16), 1730-1735.
- Han, L., Zhou, R., Niu, J., McNutt, M. A., Wang, P., and Tong, T. (2010). 'SIRT1 is regulated by a PPAR $\gamma$ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence'. *Nucleic Acids Res.* 38(21), 7458-7471.
- Han, S., Sun, H. M., Hwang, K. C., and Kim, S. W. (2015). 'Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy'. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* 25(2), 145-152.
- Han, S. M., Han, S. H., Coh, Y. R., Jang, G., Chan Ra, J., Kang, S. K., Lee, H. W., and Youn, H. Y. (2014). 'Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells'. *Exp. Mol. Med.* 46, e101.
- Hands, S. L., Proud, C. G., and Wytttenbach, A. (2009). 'mTOR's role in ageing: protein synthesis or autophagy?'. *Aging* 1(7), 586-597.
- Hanna, J. H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). 'Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues'. *Cell* 143(4), 508-525.
- Harman, D. (1956). 'Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry'. *J. Gerontol.* 11(3), 298-300.
- He, S., Nakada, D., and Morrison, S. J. (2009). 'Mechanisms of stem cell self-renewal'. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 377-406.
- Herrera, A. J., Castaño, A., Venero, J. L., Cano, J., and Machado, A. (2000). 'The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system'. *Neurobiol. Dis.* 7(4), 429-447.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., and Cabiscol, E. (2008). 'Redox control and oxidative stress in yeast cells'. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780(11), 1217-1235.
- Herrero-Martín, G., Høyer-Hansen, M., García-García, C., Fumarola, C., Farkas, T., López-Rivas, A., and Jäättelä, M. (2009). 'TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells'. *EMBO .J.* 28(6), 677-685.
- Hill, B. G., Haberzettl, P., Ahmed, Y., Srivastava, S., and Bhatnagar, A. (2008). 'Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells'. *Biochem. J.* 410(3), 525-534.

- Hipp, J., and Atala, A. (2004). 'Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy'. *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* 1(1), 3.
- Hipp, J., and Atala, A. (2008). 'Sources of stem cells for regenerative medicine'. *Stem Cell Rev.* 4(1), 3-11.
- Ho, A. D., Wagner, W., and Mahlknecht, U. (2005). 'Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine'. *EMBO Rep.* 6 Spec No, S35-38.
- Ho, P. J., Yen, M. L., Tang, B. C., Chen, C. T., and Yen, B. L. (2013). 'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation mediates differentiation capacity alteration, but not proliferative decline, in senescent human fetal mesenchymal stem cells'. *Antioxid. Redox Signal.* 18(15), 1895-1905.
- Holmes, G., Bromage, T. G., and Basilico, C. (2011). 'The Sox2 high mobility group transcription factor inhibits mature osteoblast function in transgenic mice'. *Bone* 49(4), 653-661.
- Hong, J. H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., Mueller, E., Benjamin, T., Spiegelman, B. M., Sharp, P. A., Hopkins, N., and Yaffe, M. B. (2005). 'TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation'. *Science* 309(5737), 1074-1078.
- Horman, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoigne, A., Hue, L., Proud, C., and Rider, M. (2002). 'Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis'. *Curr. Biol.* 12(16), 1419-1423.
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., Keating, A., and International Society for Cellular Therapy. (2005). 'Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement'. *Cytotherapy* 7(5), 393-395.
- Hu, L., Cheng, H., Gao, Y., Shi, M., Liu, Y., Hu, Z., Xu, J., Qiu, L., Yuan, W., Leung, A. Y., Yang, Y. G., and Cheng, T. (2014). 'Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice'. *Blood* 124(20), e45-48.
- Hubel, A. (1997). 'Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells'. *Transfus. Med. Rev.* 11(3), 224-233.
- Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., and Lako, M. (2005). 'Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages'. *Stem Cells* 23(8) 1035-1043.
- Ido, Y., Durantou, A., Lan, F., Weikel, K. A., Breton, L., and Ruderman, N. B. (2015). 'Resveratrol prevents oxidative stress-induced senescence and proliferative dysfunction by activating the AMPK-FOXO3 cascade in cultured primary human keratinocytes'. *PLoS One* 10(2), e0115341.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., and Suda, T. (2006). 'Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells'. *Nat. Med.* 12(4), 446-451.
- Jackson, A., Vayssière, B., Garcia, T., Newell, W., Baron, R., Roman-Roman, S., and Rawadi, G. (2005). 'Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells'. *Bone* 36(4), 585-598.
- Jaenisch, R., and Young, R. (2008). 'Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming'. *Cell* 132(4), 567-582.

- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B. M. (2007). 'AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ '. *Proc. Natl Acad. Sci.* 104(29), 12017-12022.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., and Bruder, S. P. (1997). 'Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro'. *J. Cell Biochem.* 64(2), 295-312.
- Jaiswal, R. K., Jaiswal, N., Bruder, S. P., Mbalaviele, G., Marshak, D. R., and Pittenger, M. F. (2000). 'Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase'. *J. Biol. Chem.* 275(13), 9645-9652.
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., and Wolff, S. P. (1991). 'Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method'. *Lipids* 26(10), 853-856.
- Jin, G. Z., Cho, S. J., Choi, E. G., Lee, Y. S., Yu, X. F., Choi, K. S., Yee, S. T., Jeon, J. T., Kim, M. O., and Kong, I. K. (2008). 'Rat mesenchymal stem cells increase tyrosine hydroxylase expression and dopamine content in ventral mesencephalic cells in vitro'. *Cell Biol. Int.* 32(11), 1433-1438.
- Jockusch, H., and Eberhard, D. (2007). 'Green fluorescent protein as a tracer in chimeric tissues: the power of vapor fixation'. *Methods Mol. Biol.* 411, 145-154.
- Jones, E. A., English, A., Kinsey, S. E., Straszynski, L., Emery, P., Ponchel, F., and McGonagle, D. (2006). 'Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow'. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70(6), 391-399.
- Justesen, J., Stenderup, K., Eriksen, E. F., and Kassem, M. (2002). 'Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures'. *Calcif. Tissue Int.* 71(1), 36-44.
- Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M., and Sugimoto, T. (2009). 'Activation of AMP kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through endothelial NOS and BMP-2 expression'. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296(1), E139-146.
- Kanda, Y., Hinata, T., Kang, S. W., and Watanabe, Y. (2011). 'Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells'. *Life Sci.* 89(7-8), 250-258.
- Kang, K. S., Wang, P., Yamabe, N., Fukui, M., Jay, T., and Zhu, B. T. (2010). 'Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation'. *PLoS One* 5(4), e10296.
- Kapur, S. K., Dos-Anjos Vilaboa, S., Llull, R., and Katz, A. J. (2015). 'Adipose tissue and stem/progenitor cells: discovery and development'. *Clin. Plast. Surg.* 42(2), 155-167.
- Karaaltin, M. V., Akpınar, A. C., Baghaki, S., and Akpınar, F. (2012). 'Treatment of "en coup de sabre" deformity with adipose-derived regenerative cell-enriched fat graft'. *J. Craniofac. Surg.* 23(2), e103-105.
- Kasapoglu, M., and Ozben, T. (2001). 'Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging'. *Exp. Gerontol.* 36(2), 209-220.
- Kashino, G., Liu, Y., Suzuki, M., Masunaga, S., Kinashi, Y., Ono, K., Tano, K., and Watanabe, M. (2010). 'An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide; possible facilitation of DNA double-strand break repair'. *J. Radiat. Res.* 51(6), 733-740.
- Katz, A. J., Tholpady, A., Tholpady, S. S., Shang, H., and Ogle, R. C. (2005). 'Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells'. *Stem Cells* 23(3), 412-423.

- Kavanagh, E., Rodhe, J., Burguillos, M. A., Venero, J. L., and Joseph, B. (2014). 'Regulation of caspase-3 processing by cIAP2 controls the switch between pro-inflammatory activation and cell death in microglia'. *Cell Death Dis.* 5, e1565.
- Kemp, K., Gordon, D., Wraith, D. C., Mallam, E., Hartfield, E., Uney, J., Wilkins, A., and Scolding, N. (2011). 'Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells'. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37(2), 166-178.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). 'Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue'. *Stem Cells* 24(5), 1294-1301.
- Kiel, M. J., He, S., Ashkenazi, R., Gentry, S. N., Teta, M., Kushner, J. A., Jackson, T. L., and Morrison, S. J. (2007). 'Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU'. *Nature* 449(7159), 238-242.
- Kim, E. K., Lim, S., Park, J. M., Seo, J. K., Kim, J. H., Kim, K. T., Ryu, S. H., and Suh, P. G. (2012). 'Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase'. *J. Cell Physiol.* 227(4), 1680-1687.
- Kim, I. S., Otto, F., Zabel, B., and Mundlos, S. (1999). 'Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1'. *Mech. Dev.* 80(2), 159-170.
- Kim, J. B., and Spiegelman, B. M. (1996). 'ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism'. *Genes Dev.* 10(9), 1096-1107.
- Kim, J. H., Park, S. H., Park, S. G., Choi, J. S., Xia, Y., and Sung, J. H. (2011). 'The pivotal role of reactive oxygen species generation in the hypoxia-induced stimulation of adipose-derived stem cells'. *Stem Cells Dev.* 20(10), 1753-161.
- Kim, W. G., Mohny, R. P., Wilson, B., Jeohn, G. H., Liu, B., and Hong, J. S. (2000). 'Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia'. *J. Neurosci.* 20(16), 6309-6316.
- Kim, W. S., Park, B. S., Kim, H. K., Park, J. S., Kim, K. J., Choi, J. S., Chung, S. J., Kim, D. D., and Sung, J. H. (2008). 'Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress'. *J. Dermatol. Sci.* 49(2), 133-142.
- Kim, W. S., Park, B. S., and Sung, J. H. (2009). 'Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging'. *Arch. Dermatol. Res.* 301(5), 329-336.
- Klotz, L. O., Hou, X., and Jacob, C. (2014). '1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling'. *Molecules* 19(9), 14902-14918.
- Knight, S., Bokhoven, M., Collins, M., and Takeuchi, Y. (2010). 'Effect of the internal promoter on insertional gene activation by lentiviral vectors with an intact HIV long terminal repeat'. *J. Virol.* 84(9), 4856-4859.
- Kobayashi, C. I., and Suda, T. (2012). 'Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells'. *J. Cell. Physiol.* 227(2), 421-430.
- Kobielak, K., Stokes, N., de la Cruz, J., Polak, L., and Fuchs, E. (2007). 'Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling'. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(24), 10063-10068.
- Komar, A. A.; Mazumder, B., and Merrick, W. C. (2012). 'A new framework for understanding IRES-mediated translation'. *Gene* 502:75-86.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., and Kishimoto, T. (1997). 'Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts'. *Cell* 89(5), 755-764.

- Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., Sensebe, L., and (ISCT). (2013). 'Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal'. *Cytotherapy* 15(9), 1054-1061.
- Krishnan, V., Bryant, H. U., and Macdougald, O. A. (2006). 'Regulation of bone mass by Wnt signaling'. *J. Clin. Invest.* 116(5), 1202-1209.
- Kulkarni, N. H., Onyia, J. E., Zeng, Q., Tian, X., Liu, M., Halladay, D. L., Frolik, C. A., Engler, T., Wei, T., Kriauciunas, A., Martin, T. J., Sato, M., Bryant, H. U., and Ma, Y. L. (2006). 'Orally bioavailable GSK-3alpha/beta dual inhibitor increases markers of cellular differentiation in vitro and bone mass in vivo'. *J. Bone Miner. Res.* 21(6), 910-920.
- Kunter, U., Rong, S., Djuric, Z., Boor, P., Müller-Newen, G., Yu, D., and Floege, J. (2006). 'Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis'. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17(8), 2202-2212.
- Langer, R., and Vacanti, J. P. (1993). 'Tissue engineering'. *Science* 260(5110), 920-926.
- Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2012). 'mTOR signaling in growth control and disease'. *Cell* 149(2), 274-293.
- Lasky, L. C. (1991). 'The role of the laboratory in marrow manipulation'. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115(3), 293-298.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). 'Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain'. *Neuroscience* 39(1), 151-170.
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R. M., Bacigalupo, A., Fibbe, W., and Ringdén, O. (2008). 'Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study'. *Lancet* 371(9624), 1579-1586.
- Le Blanc, K., and Ringdén, O. (2007). 'Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience'. *J. Intern. Med.* 262(5), 509-525.
- Lee, H. J., Jung, J., Cho, K. J., Lee, C. K., Hwang, S. G., and Kim, G. J. (2012). 'Comparison of in vitro hepatogenic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes'. *Differentiation* 84(3), 223-231.
- Lee, J., Jung, E., Kim, Y. S., Roh, K., Jung, K. H., and Park, D. (2010). 'Ultraviolet A regulates adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via up-regulation of Kruppel-like factor 2'. *J. Biol. Chem.* 285(42), 32647-32656.
- Lee, M. W., Yang, M. S., Park, J. S., Kim, H. C., Kim, Y. J., and Choi, J. (2005). 'Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood'. *Int. J. Hematol.* 81(2), 126-130.
- Lee, R. H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H. S., Suh, K., Bae, Y. C., and Jung, J. S. (2004). 'Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue'. *Cell Physiol. Biochem.* 14(4-6), 311-324.
- Lee, Y. A., Kim, Y. H., Kim, B. J., Jung, M. S., Auh, J. H., Seo, J. T., Park, Y. S., Lee, S. H., and Ryu, B. Y. (2013). 'Cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells in dimethylsulfoxide and polyethylene glycol'. *Biol. Reprod.* 89(5), 109.
- Lee, Y. M., Shin, S. I., Shin, K. S., Lee, Y. R., Park, B. H., and Kim, E. C. (2011). 'The role of sirtuin 1 in osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells'. *J. Periodontal Res.* 46(6), 712-721.

- Lendeckel, S., Jödicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J. K., Hedrick, M. H., Berthold, L., and Howaldt, H. P. (2004). 'Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report'. *J.Craniofac. Surg.* 32(6), 370-373.
- Leprivier, G., Remke, M., Rotblat, B., Dubuc, A., Mateo, A. R., Kool, M., Agnihotri, S., El-Naggar, A., Yu, B., Somasekharan, S. P., Faubert, B., Bridon, G., Tognon, C. E., Mathers, J., Thomas, R., Li, A., Barokas, A., Kwok, B., Bowden, M., Smith, S., Wu, X., Korshunov, A., Hielscher, T., Northcott, P. A., Galpin, J. D., Ahern, C. A., Wang, Y., McCabe, M. G., Collins, V. P., Jones, R. G., Pollak, M., Delattre, O., Gleave, M. E., Jan, E., Pfister, S. M., Proud, C. G., Derry, W. B., Taylor, M. D., and Sorensen, P. H. (2013). 'The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation'. *Cell* 153(5), 1064-1079.
- Leprivier, G., Rotblat, B., Khan, D., Jan, E., and Sorensen, P. H. (2014). 'Stress-mediated translational control in cancer cells'. *Biochim. Biophys. Acta* 1849(7):845-860
- Levin, S., Pevsner-Fischer, M., Kagan, S., Lifshitz, H., Weinstock, A., Gataulin, D., Friedlander, G., and Zipori, D. (2014). 'Divergent levels of LBP and TGFβ1 in murine MSCs lead to heterogenic response to TLR and proinflammatory cytokine activation'. *Stem Cell Rev.* 10(3), 376-388.
- Li, M., Guo, K., Vanella, L., Taketani, S., Adachi, Y., and Ikehara, S. (2015a). 'Stem cell transplantation upregulates Sirt1 and antioxidant expression, ameliorating fatty liver in type 2 diabetic mice'. *Int. J. Biol. Sci.* 11(4), 472-481.
- Li, Y., He, X., He, J., Anderstam, B., Andersson, G., and Lindgren, U. (2011). 'Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) affects the lineage fate determination of mesenchymal stem cells: a possible cause for reduced osteogenesis and increased adipogenesis in older individuals'. *J. Bone Miner. Res.* 26(11), 2656-2664.
- Li, Z., Hu, X., Mao, J., Liu, X., Zhang, L., Liu, J., Li, D., and Shan, H. (2015b). 'Optimization of mesenchymal stem cells (MSCs) delivery dose and route in mice with acute liver injury by bioluminescence imaging'. *Mol. Imaging Biol.* 17(2), 185-194.
- Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., Chinnaiyan, A., Israel, M. A., Goldstein, L. S., Abujarour, R., Ding, S., and Guan, K. L. (2010). 'The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation'. *Genes Dev.* 24(11), 1106-1118.
- Liang, L., Ma, T., Chen, W., Hu, J., Bai, X., Li, J., and Liang, T. (2009). 'Therapeutic potential and related signal pathway of adipose-derived stem cell transplantation for rat liver injury'. *Hepatol. Res.* 39(8), 822-832.
- Liang, H., and Ward, W. (2006). 'PGC1α: a key regulator of energy metabolism'. *Adv. Physiol. Educ.* 30:145-151.
- Lin, C. S., Xin, Z. C., Dai, J., and Lue, T. F. (2013). 'Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges'. *Histol. Histopathol.* 28(9), 1109-1116.
- Lin, C. S., Xin, Z. C., Deng, C. H., Ning, H., Lin, G., and Lue, T. F. (2010). 'Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture'. *Histol. Histopathol.* 25(6), 807-815.
- Lin, F. T., and Lane, M. D. (1992). 'Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes'. *Genes Dev.* 6(4), 533-544.
- Lin, G., Garcia, M., Ning, H., Banie, L., Guo, Y. L., Lue, T. F., and Lin, C. S. (2008). 'Defining stem and progenitor cells within adipose tissue'. *Stem Cells Dev.* 17(6), 1053-1063.
- Ling, L., Nurcombe, V., and Cool, S. M. (2009). 'Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells'. *Gene* 433(1-2), 1-7.

- Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Filì, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarlasci, V., Consoloni, L., Angelotti, M. L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2008). 'Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling'. *Stem Cells* 26(1), 279-289.
- Liu, Y., Zhang, R., Yan, K., Chen, F., Huang, W., Lv, B., Sun, C., Xu, L., Li, F., and Jiang, X. (2014). 'Mesenchymal stem cells inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of BV2 microglial cells through TSG-6'. *J. Neuroinflammation* 11, 135.
- Liu, Z.; Barrett, E. J. (2002). 'Human protein metabolism: its measurement and regulation'. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 283:1105-1112.
- Long, Y. C., and Zierath, J. R. (2006). 'AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation'. *J. Clin. Invest.* 116(7), 1776-1783.
- López-Lluch, G., and Navas, P., (2015). 'Calorie restriction as an intervention in ageing' *J. Physiol.* 000.00. 1-18.
- López-Lluch, G., Irusta, P.M., Nava, P., and de Cabo, R. (2008) 'Mitochondrial biogenesis and healthy aging' *Exp. Gerontol.* 43(9), 813-819
- Lovelock, J. E., and Bishop, M. W. (1959). 'Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide'. *Nature* 183(4672), 1394-1395.
- Lv, X. J., Zhou, G. D., Liu, Y., Liu, X., Chen, J. N., Luo, X. S., and Cao, Y. L. (2012). 'In vitro proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells isolated using anti-CD105 magnetic beads'. *Int. J. Mol. Med.* 30(4), 826-834.
- Machado, A., Herrera, A. J., Venero, J. L., Santiago, M., De Pablos, R. M., Villarán, R. F., Espinosa-Oliva, A. M., Argüelles, S., Sarmiento, M., Delgado-Cortés, M. J., Mauriño, R., and Cano, J. (2011). 'Peripheral inflammation increases the damage in animal models of nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: possible implication in Parkinson's disease incidence'. *Parkinson Dis.* 2011, 393769.
- Mambelli, L. I., Santos, E. J., Frazão, P. J., Chaparro, M. B., Kerkis, A., Zoppa, A. L., and Kerkis, I. (2009). 'Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation'. *Tissue Eng. Part. C Methods* 15(1), 87-94.
- Man, W., Ming, D., Fang, D., Chao, L., and Jing, C. (2014). 'Dimethyl sulfoxide attenuates hydrogen peroxide-induced injury in cardiomyocytes via heme oxygenase-1'. *J. Cell. Biochem.* 115(6), 1159-1165.
- Mansukhani, A., Ambrosetti, D., Holmes, G., Cornivelli, L., and Basilico, C. (2005). 'Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation'. *J. Cell. Biol.* 168(7), 1065-1076.
- Mao, Y., Yan, R., Li, A., Zhang, Y., Li, J., Du, H., Chen, B., Wei, W., Sumners, C., Zheng, H., and Li, H. (2015). 'Lentiviral Vectors Mediate Long-Term and High Efficiency Transgene Expression in HEK 293T cells'. *Int. J. Med. Sci.* 12(5), 407-415.
- Marie, P. J. (2008). 'Transcription factors controlling osteoblastogenesis'. *Arch. Biochem. Biophys.* 473(2), 98-105.
- Markarian, C. F., Frey, G. Z., Silveira, M. D., Chem, E. M., Milani, A. R., Ely, P. B., Horn, A. P., Nardi, N. B., and Camassola, M. (2014). 'Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods'. *Biotechnol. Lett.* 36(4), 693-702.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S., and Niwa, H. (2007). 'Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells'. *Nat. Cell. Biol.* 9(6), 625-635.

- Mazzocchi, G., Tevy, M. F., Borghesan, M., Delle Vergini, M. R., and Vinciguerra, M. (2014). 'Caloric restriction and aging stem cells: the stick and the carrot?' *Exp. Gerontol.* 50, 137-48.
- McGann, L. E. (1978). 'Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents'. *Cryobiology* 15(4), 382-390.
- Meagher, R. C., and Herzig, R. H. (1993). 'Techniques of harvesting and cryopreservation of stem cells'. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 7(3), 501-533.
- Meng, Q., Haque, A., Hexig, B., and Akaike, T. (2012). 'The differentiation and isolation of mouse embryonic stem cells toward hepatocytes using galactose-carrying substrata'. *Biomaterials* 33(5), 1414-1427.
- Merceron, C., Vinatier, C., Portron, S., Masson, M., Amiaud, J., Guigand, L., Chérel, Y., Weiss, P., and Guicheux, J. (2010). 'Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells'. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 298(2), C355-364.
- Meryman, H. T. (1971). 'Cryoprotective agents'. *Cryobiology* 8(2), 173-183.
- Mesimäki, K., Lindroos, B., Törnwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., Miettinen, S., and Suuronen, R. (2009). 'Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells'. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 38(3), 201-209.
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). 'High gradient magnetic cell separation with MACS'. *Cytometry* 11(2), 231-238.
- Mishima, O., and Suzuki, Y. (2002). 'Propagation of the polyamorphic transition of ice and the liquid-liquid critical point'. *Nature* 419(6907), 599-603.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). 'The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells'. *Cell* 113(5), 631-642.
- Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., and Hirao, A. (2007). 'Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool'. *Cell Stem Cell* 1(1), 101-112.
- Moerman, E. J., Teng, K., Lipschitz, D. A., and Lecka-Czernik, B. (2004). 'Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways'. *Aging Cell* 3(6), 379-389.
- Moldovan, N. I. (2005). 'Emerging roles of reactive oxygen and nitrogen species in stem/progenitor cells'. *Antioxid. Redox Signal.* 7(11-12), 1409-1412.
- Molofsky, A. V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I. K., Clarke, M. F., and Morrison, S. J. (2003). 'Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation'. *Nature* 425(6961), 962-967.
- Morrison, S. J., and Spradling, A. C. (2008). 'Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life'. *Cell* 132(4), 598-611.
- Mueller, E., Drori, S., Aiyer, A., Yie, J., Sarraf, P., Chen, H., Hauser, S., Rosen, E. D., Ge, K., Roeder, R. G., and Spiegelman, B. M. (2002). 'Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms'. *J. Biol. Chem.*, 277(44), 41925-41930.
- Murray, I. R., West, C. C., Hardy, W. R., James, A. W., Park, T. S., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L., Soo, C., and Péault, B. (2014). 'Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels'. *Cell Mol. Life. Sci.* 71(8), 1353-1374.

- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., and de Crombrughe, B. (2002). 'The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation'. *Cell* 108(1), 17-29.
- Neirinckx, V., Marquet, A., Coste, C., Rogister, B., and Wislet-Gendebien, S. (2013). 'Adult bone marrow neural crest stem cells and mesenchymal stem cells are not able to replace lost neurons in acute MPTP-lesioned mice' *PLoS One* 8(5), e64723.
- Niemann, B., Pan, R., Teschner, M., Boening, A., Silber, R. E., and Rohrbach, S. (2013). 'Age and obesity-associated changes in the expression and activation of components of the AMPK signaling pathway in human right atrial tissue'. *Exp. Gerontol.*, 48(1), 55-63.
- Nishino, J., Kim, I., Chada, K., and Morrison, S. J. (2008). 'Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression'. *Cell* 135(2), 227-239.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). 'Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells'. *Nat. Genet.* 24(4), 372-376.
- Norwood, T. H., Zeigler, C. J., and Martin, G. M. (1976). 'Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion'. *Somatic Cell Genet.* 2(3), 263-270.
- Oedayrajsingh-Varma, M. J., van Ham, S. M., Knippenberg, M., Helder, M. N., Klein-Nulend, J., Schouten, T. E., Ritt, M. J., and van Milligen, F. J. (2006). 'Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure'. *Cytotherapy.* 8(2), 166-177.
- Ogura, F., Wakao, S., Kuroda, Y., Tsuchiyama, K., Bagheri, M., Heneidi, S., Chazenbalk, G., Aiba, S., and Dezawa, M. (2014). 'Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine'. *Stem Cells Dev.* 23(7), 717-728.
- Ohta, Y., Takenaga, M., Tokura, Y., Hamaguchi, A., Matsumoto, T., Kano, K., Mugishima, H., Okano, H., and Igarashi, R. (2008). 'Mature adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT), promoted functional recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats'. *Cell Transplant.* 17(8), 877-886.
- Ooi, Y. Y., Dheen, S. T., and Tay, S. S. (2015). 'Paracrine effects of mesenchymal stem cells-conditioned medium on microglial cytokines expression and nitric oxide production'. *Neuroimmunomodulation* 22(4), 233-242.
- Ortiz-Colón, G., Grant, A. C., Doumit, M. E., and Buskirk, D. D. (2009). 'Bovine intramuscular, subcutaneous, and perirenal stromal-vascular cells express similar glucocorticoid receptor isoforms, but exhibit different adipogenic capacity'. *J. Anim. Sci.* 87(6), 1913-1920.
- Ota, M., and Sasaki, H. (2008). 'Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling'. *Development* 135(24), 4059-4069.
- Owen, M. (1988). 'Marrow stromal stem cells'. *J. Cell. Sci. Suppl.* 10, 63-76.
- Ozdemir, M., Attar, A., Kuzu, I., Ayten, M., Ozgencil, E., Bozkurt, M., Dalva, K., Uckan, D., Kılıc, E., Sancak, T., Kanpolat, Y., and Beksac, M. (2012). 'Stem cell therapy in spinal cord injury: in vivo and postmortem tracking of bone marrow mononuclear or mesenchymal stem cells'. *Stem Cell Rev.* 8(3), 953-962.
- Pacchiarotti, J., Ramos, T., Howerton, K., Greilach, S., Zaragoza, K., Olmstead, M., and Izadyar, F. (2013). 'Developing a clinical-grade cryopreservation protocol for human testicular tissue and cells'. *Biomed. Res. Int.* 2013, 930962.
- Pacholec, M., Bleasdale, J. E., Chrnyk, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R. S., Griffith, D., Griffor, M., Loulakis, P., Pabst, B., Qiu, X., Stockman, B., Thanabal, V.,

- Varghese, A., Ward, J., Withka, J., and Ahn, K. (2010). 'SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1'. *J. Biol. Chem.* 285(11), 8340-8351.
- Pak, J. (2012). 'Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads'. *Pain Physician* 15(1), 75-85.
- Pamplona, R., and Barja, G. (2006). 'Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection'. *Biochim. Biophys. Acta* 1757(5-6), 496-508.
- Pan, D. (2007). 'Hippo signaling in organ size control'. *Genes Dev.* 21(8), 886-897.
- Pan, D. (2010). 'The hippo signaling pathway in development and cancer'. *Dev. Cell* 19(4), 491-505
- Pantovic, A., Krstic, A., Janjetovic, K., Kocic, J., Harhaji-Trajkovic, L., Bugarski, D., and Trajkovic, V. (2013). 'Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells'. *Bone* 52(1), 524-531.
- Park, S. B., Seo, K. W., So, A. Y., Seo, M. S., Yu, K. R., Kang, S. K., and Kang, K. S. (2012). 'SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC'. *Cell Death Differ.* 19(3), 534-545.
- Park, S. G., Kim, J. H., Xia, Y., and Sung, J. H. (2011). 'Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe?' *Expert Opin. Ther. Targets* 15(11), 1297-1306.
- Parrado, J.; Absi, E. H.; Machado, A., and Ayala, A. (2003). "'In vitro" effect of cumene hydroperoxide on hepatic elongation factor-2 and its protection by melatonin'. *Biochim. Biophys. Acta* 1624:139-144.
- Parrado, J., Bougria, M., Ayala, A., Castaño, A., and Machado, A. (1999). 'Effects of aging on the various steps of protein synthesis: fragmentation of elongation factor 2'. *Free Radic. Biol. Med.* 26(3-4), 362-370.
- Patterson, G. H. (2007). 'Fluorescent proteins for cell biology'. *Methods Mol. Biol.* 411, 47-80.
- Paxinos, G., and Watson, C. 'The rat brain in stereotaxic coordinates' (1986). Academic Press 2nd Edition.
- Pelttari, K., Steck, E., and Richter, W. (2008). 'The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis'. *Injury* 39 Suppl 1, S58-65.
- Peltz, L., Gomez, J., Marquez, M., Alencastro, F., Atashpanjeh, N., Quang, T., Bach, T., and Zhao, Y. (2012) 'Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development'. *PLoS One* 7(5), e37162.
- Peptan, I. A., Hong, L., and Mao, J. J. (2006). 'Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits'. *Plast. Reconstr. Surg.* 117(5), 1462-1470.
- Periyasamy-Thandavan, S., Herberg, S., Arounleut, P., Upadhyay, S., Dukes, A., Davis, C., Johnson, M., McGee-Lawrence, M., Hamrick, M. W., Isales, C. M., and Hill, W. D. (2015). 'Caloric restriction and the adipokine leptin alter the SDF-1 signaling axis in bone marrow and in bone marrow derived mesenchymal stem cells'. *Mol. Cell Endocrinol.* 1(1 Suppl): A135–A587.
- Perotti, C. G., Del Fante, C., Viarengo, G., Papa, P., Rocchi, L., Bergamaschi, P., Bellotti, L., Marchesi, A., and Salvaneschi, L. (2004). 'A new automated cell washer device for thawed cord blood units'. *Transfusion* 44(6), 900-906.

- Peterson, B., Zhang, J., Iglesias, R., Kabo, M., Hedrick, M., Benhaim, P., and Lieberman, J. R. (2005). 'Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue'. *Tissue Eng.* 11(1-2), 120-129.
- Piwien-Pilipuk, G.; Ayala, A.; Machado, A., and Galigniana, M. D. (2002). 'Impairment of mineralocorticoid receptor (MR)-dependent biological response by oxidative stress and aging: correlation with post-translational modification of MR and decreased ADP-ribosylatable level of elongating factor 2 in kidney cells'. *J. Biol. Chem.* 277:11896-11903.
- Poloni, A., Maurizi, G., Serrani, F., Mancini, S., Zingaretti, M. C., Frontini, A., Cinti, S., Olivieri, A., and Leoni, P. (2013). 'Molecular and functional characterization of human bone marrow adipocytes'. *Exp. Hematol.* 41(6), 558-566.e2.
- Poncelet, A. J., Verduyck, J., Saliez, A., and Gianello, P. (2007) 'Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo'. *Transplantation* 83(6), 783-790.
- Pountos, I., Corscadden, D., Emery, P., and Giannoudis, P. V. (2007). 'Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application'. *Injury* 38 Suppl 4, S23-33.
- Preffer, F., and Dombkowski, D. (2009). 'Advances in complex multiparameter flow cytometry technology: Applications in stem cell research'. *Cytometry B Clin. Cytom.* 76(5), 295-314.
- Prestwich, T. C., and Macdougald, O. A. (2007). 'Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism'. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 19(6), 612-617.
- Proud, C. G. (2002). 'Regulation of mammalian translation factors by nutrients'. *Eur. J. Biochem.* 269:5338-5349.
- Proud, C. G. (2007). 'Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery'. *Biochem. J.* 403(2), 217-234.
- Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., André, M., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). 'From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences'. *Exp. Cell. Res.* 312(6), 727-736.
- Purohit, J. S., Hu, P., Burke, S. J., Collier, J. J., Chen, J., and Zhao, L. (2013). 'The effects of NOD activation on adipocyte differentiation'. *Obesity* 21(4), 737-47.
- Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., Rosenbaum, M., Zhao, Y., Gu, W., Farmer, S. R., and Accili, D. (2012). 'Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppar $\gamma$ '. *Cell.* 150(3), 620-32.
- Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., and Deliliers, G. L. (2002). 'Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies'. *Exp. Hematol.* 30(7), 783-91.
- Raicevic, G., Rouas, R., Najar, M., Stordeur, P., Boufker, H. I., Bron, D., Martiat, P., Goldman, M., Nevešignsky, M. T., and Lagneaux, L. (2010). 'Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells'. *Hum. Immunol.* 71(3), 235-44.
- Rattan, S. I. (2010). 'Synthesis, modification and turnover of proteins during aging'. *Adv. Exp. Med. Biol.* 694:1-13.
- Reekmans, K., De Vocht, N., Praet, J., Le Blon, D., Hoornaert, C., Daans, J., Van der Linden, A., Berneman, Z., and Ponsaerts, P. (2013). 'Quantitative evaluation of stem cell grafting in the central nervous system of mice by in vivo bioluminescence imaging and postmortem multicolor histological analysis'. *Methods Mol. Biol.* 1052, 125-41.
- Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., and Puigserver, P. (2005). 'Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1'. *Nature* 434(7029), 113-8.

- Romieu-Mourez, R., François, M., Boivin, M. N., Bouchentouf, M., Spaner, D. E., and Galipeau, J. (2009). 'Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype'. *J. Immunol.* 182(12), 7963-73.
- Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., and Spiegelman, B. M. (2002). 'C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway'. *Genes Dev.* 16(1), 22-6.
- Ryazanov, A. G., and Nefsky, B. S. (2002). 'Protein turnover plays a key role in aging'. *Mech. Ageing Dev.* 123(2-3), 207-13.
- Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y. D., Wilkison, W. O., Gimble, J. M., and Rice, H. E. (2002). 'Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294(2), 371-9.
- Samulin, J., Berget, I., Lien, S., and Sundvold, H. (2008). 'Differential gene expression of fatty acid binding proteins during porcine adipogenesis'. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151(2), 147-52.
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., and Saldanha, C. (2003). 'Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects'. *Biochem. Pharmacol.* 65(7), 1035-41.
- Sart, S., Song, L., and Li, Y. (2015). 'Controlling redox status for stem cell survival, expansion and differentiation'. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015:105-135
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., Takimoto, R., Iyama, S., Matsunaga, T., Ohtani, S., Matsuura, A., Hamada, H., and Niitsu, Y. (2005). 'Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion'. *Blood* 106(2), 756-63.
- Schäffler, A., and Büchler, C. (2007). 'Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies'. *Stem Cells* 25(4), 818-27.
- Scheffler, B., Schmandt, T., Schröder, W., Steinfarz, B., Hussein, L., Wellmer, J., Seifert, G., Karam, K., Beck, H., Blümcke, I., Wiestler, O. D., Steinhäuser, C., and Brüstle, O. (2003). 'Functional network integration of embryonic stem cell-derived astrocytes in hippocampal slice cultures'. *Development* 130(22), 5533-41.
- Schenke-Layland, K., Strem, B. M., Jordan, M. C., Deemedio, M. T., Hedrick, M. H., Roos, K. P., Fraser, J. K., and MacLellan, W. R. (2009). 'Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction'. *J. Surg. Res.* 153(2), 217-23.
- Schmuck, E. G., Mulligan, J. D., and Saupe, K. W. (2011). 'Caloric restriction attenuates the age-associated increase of adipose-derived stem cells but further reduces their proliferative capacity'. *Age* 33(2), 107-18.
- Schönitzer, V., Wirtz, R., Ulrich, V., Berger, T., Karl, A., Mutschler, W., Schieker, M., and Böcker, W. (2014). 'Sox2 is a potent inhibitor of osteogenic and adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells'. *Cell Reprogram.* 16(5), 355-65.
- Schwerk, A., Altschüler, J., Roch, M., Gossen, M., Winter, C., Berg, J., Kurtz, A., and Steiner, B. (2015). 'Human adipose-derived mesenchymal stromal cells increase endogenous neurogenesis in the rat subventricular zone acutely after 6-hydroxydopamine lesioning'. *Cytotherapy* 17(2), 199-214.
- Seo, E., Basu-Roy, U., Gunaratne, P. H., Coarfa, C., Lim, D. S., Basilico, C., and Mansukhani, A. (2013). 'SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage'. *Cell Rep.* 3(6), 2075-87.

- Seo, E., Basu-Roy, U., Zavadil, J., Basilico, C., and Mansukhani, A. (2011). 'Distinct functions of Sox2 control self-renewal and differentiation in the osteoblast lineage'. *Mol. Cell. Biol.* 31(22), 4593-608.
- Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A. (2006). 'Aging of mesenchymal stem cells'. *Ageing Res. Rev.* 5(1), 91-116.
- Shakibaei, M., Shayan, P., Busch, F., Aldinger, C., Buhrmann, C., Lueders, C., and Mobasher, A. (2012). 'Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation'. *PLoS One* 7(4), e35712.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., and Tsien, R. Y. (2005). 'A guide to choosing fluorescent proteins'. *Nat. Methods* 2(12), 905-9.
- Shimoyama, A., Wada, M., Ikeda, F., Hata, K., Matsubara, T., Nifuji, A., Noda, M., Amano, K., Yamaguchi, A., Nishimura, R., and Yoneda, T. (2007). 'Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function'. *Mol. Biol. Cell.* 18(7), 2411-8.
- Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., and Schäfer, R. (2013). 'Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells'. *BMC Med.* 11, 146.
- Signer, R. A.; Magee, J. A.; Salic, A., and Morrison, S. J. (2014). 'Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate'. *Nature* 509:49-54.
- Simic, P., Zainabadi, K., Bell, E., Sykes, D. B., Saez, B., Lotinun, S., Baron, R., Scadden, D., Schipani, E., and Guarente, L. (2013). 'SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating  $\beta$ -catenin'. *EMBO Mol. Med.*, 5(3), 430-40.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B., and Lefebvre, V. (2001). 'The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation'. *Dev. Cell.* 1(2), 277-90.
- Song, K., Huang, M., Shi, Q., Du, T., and Cao, Y. (2014). 'Cultivation and identification of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells'. *Mol. Med. Rep.* 10(2), 755-60.
- Sorolla, M.A., Rodríguez-Colmán, M.J., Tamarit, J., Ortega, Z., Lucas, J.J., Ferrer, I., Ros, J., and Cabiscol, E. (2010). 'Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism'. *Free Radic. Biol. Med.* 15;49(4):612-621.
- Sorolla, M.A., Rodríguez-Colmán, M.J., Vall-llaura, N., Tamarit, J., Ros, J., and Cabiscol, E. (2012). 'Protein oxidation in Huntington disease' *Biofactors* 38(3):173-185.
- Sousa, B. R., Parreira, R. C., Fonseca, E. A., Amaya, M. J., Tonelli, F. M., Lacerda, S. M., Lalwani, P., Santos, A. K., Gomes, K. N., Ulrich, H., Kihara, A. H., and Resende, R. R. (2014). 'Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications'. *Cytometry A* 85(1),43-77.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R., and Spiegelman, B. M. (2006). 'Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators'. *Cell* 127(2), 397-408.
- Starossom, S. C., Mascanfroni, I. D., Imitola, J., Cao, L., Raddassi, K., Hernandez, S. F., Bassil, R., Croci, D. O., Cerliani, J. P., Delacour, D., Wang, Y., Elyaman, W., Khoury, S. J., and Rabinovich, G. A. (2012). 'Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration'. *Immunity* 37(2), 249-63.
- Stemberger, S., Jamnig, A., Stefanova, N., Lepperdinger, G., Reindl, M., and Wenning, G. K. (2011). 'Mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and neuroprotection'. *PLoS One* 6(5), e19808.

- Stolzing, A., Naaldijk, Y., Fedorova, V., and Sethe, S. (2012). 'Hydroxyethylstarch in cryopreservation - mechanisms, benefits and problems'. *Transfus. Apher. Sci.* 46(2), 137-47.
- Sudo, H., Kodama, H. A., Amagai, Y., Yamamoto, S., and Kasai, S. (1983). 'In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria'. *J. Cell. Biol.* 96(1), 191-8.
- Suga, H., Matsumoto, D., Eto, H., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Araki, J., and Yoshimura, K. (2009). 'Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells'. *Stem Cells Dev.* 18(8), 1201-10.
- Sun, Y., Yin, Y., Zhang, J., Yu, H., Wang, X., Wu, J., and Xue, Y. (2008). 'Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene'. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71(2), 446-53.
- Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F. H., Rodríguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J. C. (2006). 'Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103(27), 10294-9.
- Swenson, E. S., Price, J. G., Brazelton, T., and Krause, D. S. (2007). 'Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker'. *Stem Cells* 25(10), 2593-600.
- Takada, I., Kouzmenko, A. P., and Kato, S. (2009). 'Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis'. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5(8), 442-7.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). 'Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors'. *Cell* 131(5), 861-72.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). 'Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors'. *Cell* 126(4), 663-76.
- Takahashi, T. (2011). 'Overexpression of Runx2 and MKP-1 stimulates transdifferentiation of 3T3-L1 preadipocytes into bone-forming osteoblasts in vitro'. *Calcif. Tissue Int.* 88(4) 336-347.
- Takahashi, T., Hirsh, A., Erbe, E., and Williams, R. J. (1988). 'Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes'. *Biophys. J.* 54(3), 509-18.
- Tallone, T., Realini, C., Böhmeler, A., Kornfeld, C., Vassalli, G., Moccetti, T., Bardelli, S., and Soldati, G. (2011). 'Adult human adipose tissue contains several types of multipotent cells'. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 4(2), 200-10.
- Tanito, M., Agbaga, M. P., and Anderson, R. E. (2007). 'Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro'. *Free Radic. Biol. Med.* 42(12), 1838-50.
- Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J. J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Splingard, M., Dulong, J., Monnier, D., Gourmelon, P., Gorin, N. C., and Sensebé, L. (2010). 'Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation'. *Blood* 115(8), 1549-53.
- Taylor, J. A. (2010). 'Bilateral orbitozygomatic reconstruction with tissue-engineered bone'. *J. Craniofac. Surg.* 21(5), 1612-4.
- Tchkonia, T., Lenburg, M., Thomou, T., Giordadze, N., Frampton, G., Pirtskhalava, T., Cartwright, A., Cartwright, M., Flanagan, J., Karagiannides, I., Gerry, N., Forse, R. A., Tchoukalova, Y., Jensen, M. D., Pothoulakis, C., and Kirkland, J. L. (2007). 'Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns'. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292(1), E298-307.

- Teo, A. K., and Vallier, L. (2010). 'Emerging use of stem cells in regenerative medicine'. *Biochem. J.* 428(1), 11-23.
- Thakur, R. S., Tousif, S., Awasthi, V., Sanyal, A., Atul, P. K., Punia, P., and Das, J. (2013). 'Mesenchymal stem cells play an important role in host protective immune responses against malaria by modulating regulatory T cells'. *Eur. J. Immunol.* 43(8), 2070-7.
- Thesleff, T., Lehtimäki, K., Niskakangas, T., Mannerström, B., Miettinen, S., Suuronen, R., and Öhman, J. (2011). 'Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction'. *Neurosurgery* 68(6), 1535-40.
- Thirumala, S., Zvonic, S., Floyd, E., Gimble, J. M., and Devireddy, R. V. (2005). 'Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells'. *Biotechnol. Prog.* 21(5), 1511-24.
- Thompson, A. M., Wagner, R., and Rzuclido, E. M. (2014). 'Age-related loss of SirT1 expression results in dysregulated human vascular smooth muscle cell function'. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307(4), H533-41.
- Thornton, S., Anand, N., Purcell, D., and Lee, J. (2003). 'Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis'. *J. Mol. Med.* 81(9), 536-48.
- Tichon, A., Eitan, E., Kurkalli, B. G., Braiman, A., Gazit, A., Slavin, S., Beith-Yannai, E., and Priel, E. (2013). 'Oxidative stress protection by novel telomerase activators in mesenchymal stem cells derived from healthy and diseased individuals'. *Curr. Mol. Med.* 13(6), 1010-22.
- Tokalov, S. V., Gruener, S., Schindler, S., Iagunov, A. S., Baumann, M., and Abolmaali, N. D. (2007). 'A number of bone marrow mesenchymal stem cells but neither phenotype nor differentiation capacities changes with age of rats'. *Mol. Cells* 24(2), 255-60.
- Torres, J., and Watt, F. M. (2008). 'Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3'. *Nat. Cell Biol.* 10(2), 194-201.
- Tropel, D., Bähler, A., Globig, K., and van der Meer, J. R. (2004). 'Design of new promoters and of a dual-bioreporter based on cross-activation by the two regulatory proteins XylR and HbpR'. *Environ. Microbiol.* 6(11), 1186-96.
- Trounson, A., Thakar, R. G., Lomax, G., and Gibbons, D. (2011). 'Clinical trials for stem cell therapies'. *BMC Med.* 9, 52.
- Trzaska, K. A., and Rameshwar, P. (2011). 'Dopaminergic neuronal differentiation protocol for human mesenchymal stem cells'. *Methods Mol. Biol.* 698, 295-303.
- Tseng, P. C., Hou, S. M., Chen, R. J., Peng, H. W., Hsieh, C. F., Kuo, M. L., and Yen, M. L. (2011). 'Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis'. *J. Bone Miner. Res.* 26(10), 2552-63.
- Tsien, R. Y. (1998). 'The green fluorescent protein'. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-44.
- Tárnok, A., Ulrich, H., and Bocsi, J. (2010). 'Phenotypes of stem cells from diverse origin'. *Cytometry A* 77(1), 6-10.
- Ulrich, H., do Nascimento, I. C., Bocsi, J., and Tárnok, A. (2015). 'Immunomodulation in stem cell differentiation into neurons and brain repair'. *Stem Cell Rev.* 11(3), 474-86.
- Urs, S., Venkatesh, D., Tang, Y., Henderson, T., Yang, X., Friesel, R. E., Rosen, C. J., and Liaw, L. (2010). 'Sprouty1 is a critical regulatory switch of mesenchymal stem cell lineage allocation'. *FASEB J.* 24(9), 3264-73.
- Valle-Prieto, A., and Conget, P. A. (2010). 'Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress'. *Stem Cells Dev.* 19(12), 1885-93.
- Venero, J. L., Burguillos, M. A., and Joseph, B. (2013). 'Caspases playing in the field of neuroinflammation: old and new players'. *Dev. Neurosci.* 35(2-3), 88-101.

- Verbon, E. H., Post, J. A., and Boonstra, J. (2012). 'The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells'. *Gene* 511(1), 1-6.
- Vigneron, A., and Vousden, K. H. (2010). 'p53, ROS and senescence in the control of aging'. *Aging* 2(8), 471-4.
- Vingtdeux, V., Chandakkar, P., Zhao, H., Davies, P., and Marambaud, P. (2011). 'Small-molecule activators of AMP-activated protein kinase (AMPK), RSVA314 and RSVA405, inhibit adipogenesis'. *Mol. Med.* 17(9-10), 1022-30.
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., and Boyd, M. R. (1991). 'Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production'. *Cancer Res.* 51(10), 2515-20.
- von Tigerstrom, B. (2009). 'Product regulation and the clinical translation of stem cell research'. *Stem Cell Rev.* 5(2), 135-9.
- Vroemen, M., Weidner, N., and Blesch, A. (2005). 'Loss of gene expression in lentivirus- and retrovirus-transduced neural progenitor cells is correlated to migration and differentiation in the adult spinal cord'. *Exp. Neurol.* 195(1), 127-39.
- Wang, F., Yasuhara, T., Shingo, T., Kameda, M., Tajiri, N., Yuan, W. J., Kondo, A., Kadota, T., Baba, T., Tayra, J. T., Kikuchi, Y., Miyoshi, Y., and Date, I. (2010a). 'Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats: focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1alpha'. *BMC Neurosci.* 11, 52.
- Wang, L., Deng, J., Tian, W., Xiang, B., Yang, T., Li, G., Wang, J., Gruwel, M., Kashour, T., Rendell, J., Glogowski, M., Tomanek, B., Freed, D., Deslauriers, R., Arora, R. C., and Tian, G. (2009). 'Adipose-derived stem cells are an effective cell candidate for treatment of heart failure: an MR imaging study of rat hearts'. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297(3), H1020-31.
- Wang, Y., Liu, L., Pazhanisamy, S. K., Li, H., Meng, A., and Zhou, D. (2010b). 'Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells'. *Free Radic. Biol. Med.* 48(2), 348-56.
- Wang, Y., Yang, J., Li, H., Wang, X., Zhu, L., and Fan, M. (2013). 'Hypoxia promotes dopaminergic differentiation of mesenchymal stem cells and shows benefits for transplantation in a rat model of Parkinson's disease'. *PLoS One* 8(1), e54296.
- Watroba, M., and Szukiewicz D. (2016). 'The role of sirtuins in aging and age-related diseases'. *Adv. Med. Sci.* 61:52-62.
- Wenz, T., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., Spiegelman, B. M., and Moraes, C. T. (2009). 'Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106(48), 20405-10.
- Whone, A. L., Kemp, K., Sun, M., Wilkins, A., and Scolding, N. J. (2012). 'Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor'. *Brain Res.* 1431, 86-96.
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C. F., Eshkind, L., Bockamp, E., Lió, P., Macdonald, H. R., and Trumpp, A. (2008). 'Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair'. *Cell* 135(6), 1118-29.
- Windrum, P., Morris, T. C., Drake, M. B., Niederwieser, D., and Ruutu, T. (2005). 'Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres'. *Bone Marrow Transplant* 36(7), 601-3.
- Wolbank, S., Peterbauer, A., Wassermann, E., Hennerbichler, S., Voglauer, R., van Griensven, M., Duba, H. C., Gabriel, C., and Redl, H. (2007). 'Labelling of human

- adipose-derived stem cells for non-invasive in vivo cell tracking'. *Cell Tissue Bank* 8(3), 163-77.
- Xu, X., Liu, Y., Cui, Z., Wei, Y., and Zhang, L. (2012). 'Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation'. *J. Biotechnol.* 162(2-3), 224-31.
- Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R. G., Kobayashi, N., and Yarmush, M. L. (2010). 'Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing'. *Cell Transplant* 19(6), 667-79.
- Yamaguchi, A., Komori, T., and Suda, T. (2000). 'Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1'. *Endocr. Rev.* 21(4), 393-411.
- Yamanaka, S. (2008). 'Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors'. *Cell Prolif.* 41 Suppl 1, 51-6.
- Yang, Y. C., Liu, B. S., Shen, C. C., Lin, C. H., Chiao, M. T., and Cheng, H. C. (2011). 'Transplantation of adipose tissue-derived stem cells for treatment of focal cerebral ischemia'. *Curr. Neurovasc. Res.* 8(1), 1-13.
- Yilmaz, O. H., Valdez, R., Theisen, B. K., Guo, W., Ferguson, D. O., Wu, H., and Morrison, S. J. (2006). 'Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells'. *Nature* 441(7092), 475-82.
- Yin, L., Zhu, Y., Yang, J., Ni, Y., Zhou, Z., Chen, Y., and Wen, L. (2015). 'Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro'. *Mol. Med. Rep.* 11(3), 1722-32.
- Yoon, D. S., Choi, Y., Jang, Y., Lee, M., Choi, W. J., Kim, S. H., and Lee, J. W. (2014). 'SIRT1 directly regulates SOX2 to maintain self-renewal and multipotency in bone marrow-derived mesenchymal stem cells'. *Stem Cells* 32(12), 3219-31.
- Yoon, E., Dhar, S., Chun, D. E., Gharibjanian, N. A., and Evans, G. R. (2007). 'In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model'. *Tissue Eng.* 13(3), 619-27.
- Yoshimura, K., Asano, Y., Aoi, N., Kurita, M., Oshima, Y., Sato, K., Inoue, K., Suga, H., Eto, H., Kato, H., and Harii, K. (2010). 'Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications'. *Breast J.* 16(2), 169-75.
- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Inoue, K., Suga, H., Eto, H., Kato, H., Hirohi, T., and Harii, K. (2008). 'Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells'. *Dermatol Surg.* 34(9), 1178-85.
- Yu, J. M., Wu, X., Gimble, J. M., Guan, X., Freitas, M. A., and Bunnell, B. A. (2011). 'Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow'. *Aging Cell* 10(1), 66-79.
- Yuan, H. F., Zhai, C., Yan, X. L., Zhao, D. D., Wang, J. X., Zeng, Q., Chen, L., Nan, X., He, L. J., Li, S. T., Yue, W., and Pei, X. T. (2012). 'SIRT1 is required for long-term growth of human mesenchymal stem cells'. *J. Mol. Med. (Berl)* 90(4), 389-400.
- Zaidi, S. K., Sullivan, A. J., Medina, R., Ito, Y., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., and Stein, G. S. (2004). 'Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription'. *EMBO J.* 23(4), 790-9.
- Zangi, L., Margalit, R., Reich-Zeliger, S., Bachar-Lustig, E., Beilhack, A., Negrin, R., and Reisner, Y. (2009). 'Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells'. *Stem Cells* 27(11), 2865-74.
- Zhang, D., Yan, B., Yu, S., Zhang, C., Wang, B., Wang, Y., Wang, J., Yuan, Z., Zhang, L., and Pan, J. (2015). 'Coenzyme Q10 inhibits the aging of mesenchymal stem cells

- induced by D-galactose through Akt/mTOR signaling'. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015, 867293.
- Zhang, G., Gurtu, V., and Kain, S. R. (1996). 'An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227(3), 707-11.
- Zhang, H. W., Ding, J., Jin, J. L., Guo, J., Liu, J. N., Karaplis, A., Goltzman, D., and Miao, D. (2010). 'Defects in mesenchymal stem cell self-renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi-1 null mice'. *J. Bone Miner. Res.* 25(3), 640-52.
- Zhang, L. (2015). 'Control of growth and beyond: a special issue on Hippo signaling'. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 47(1), 1.
- Zhao, B., Tumaneng, K., and Guan, K. L. (2011a). 'The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal'. *Nat. Cell Biol.* 13(8), 877-83.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., and Guan, K. L. (2007). 'Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control'. *Genes Dev.* 21(21), 2747-61.
- Zhao, H., Doyle, T. C., Coquoz, O., Kalish, F., Rice, B. W., and Contag, C. H. (2005). 'Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo'. *J. Biomed. Opt.* 10(4), 41210.
- Zhao, J. X., Yue, W. F., Zhu, M. J., and Du, M. (2011b). 'AMP-activated protein kinase regulates beta-catenin transcription via histone deacetylase 5'. *J. Biol. Chem.* 286(18), 16426-34.
- Zheng, H., Guo, Z., Ma, Q., Jia, H., and Dang, G. (2004). 'Cbf1/osl2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation in vitro and in vivo'. *Calcif. Tissue Int.* 74(2), 194-203.
- Zhou, F., Zhao, M., Zhao, H., Sun, W., and Cui, C. (2014). 'Effects of oxidative modification on gel properties of isolated porcine myofibrillar protein by peroxy radicals'. *Meat Sci.* 96(4), 1432-9.
- Zhou, S., Greenberger, J. S., Epperly, M. W., Goff, J. P., Adler, C., Leboff, M. S., and Glowacki, J. (2008). 'Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts'. *Aging Cell* 7(3), 335-43.
- Zhu, M., Kohan, E., Bradley, J., Hedrick, M., Benhaim, P., and Zuk, P. (2009). 'The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells'. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3(4), 290-301.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2002). 'Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells'. *Mol. Biol. Cell* 13(12), 4279-95.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001). 'Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies'. *Tissue Eng.* 7(2), 211-28.