



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

---

**PRODUCCIÓN XENO-FREE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES  
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO Y EVALUACIÓN DE SU  
SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE**

**CARLOS HUGO ESCOBAR SOTO**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

---

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

---

**Tesis presentada como requisito para optar por el título de:**  
**Doctor en Ciencias Biomédicas**

**PRODUCCIÓN XENO-FREE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES  
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO Y EVALUACIÓN DE SU  
SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE**

**CARLOS HUGO ESCOBAR SOTO**

**DIRECTOR:**  
**ORLANDO CHAPARRO GARZÓN, PhD**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

# RESUMEN

**Introducción.** Las moléculas de origen animal o bacteriano que habitualmente son usadas en los protocolos de extracción, cultivo y criopreservación de Células Madre derivadas de Tejido Adiposo humano (human Adipose derived Stem Cells, hASC) significan un riesgo de rechazo inmunológico contra las células trasplantadas y/o desarrollo de zoonosis. La capacidad de inducir la regeneración tisular de las ASC, depende al menos en parte, de factores de efecto paracrino liberados por ellas. Pero también se ha demostrado que la capacidad de inducir regeneración tisular, tiene una relación inversa con el pase al que se encuentran las células. Caracterizar el secretoma neovascularizante de las hASC, es una forma adecuada de evaluar el impacto de la producción xeno-free y el pase celular, sobre el potencial regenerador de las células. **Materiales y Métodos.** Después de desarrollar un protocolo de producción xeno-free para las hASC, las células fueron caracterizadas de acuerdo a su inmunofenotipo y potencial de diferenciación. Después de recolectar el medio condicionado (MC) por las hASC de cuarto y séptimo pase, con un arreglo de anticuerpos se evaluó cualitativa, cuantitativamente el secretoma de las hASC xeno-free, comparándolo con el de las células producidas en condiciones estándar. Además se evaluó la capacidad funcional de estos MC en ensayos de formación de tubos en matrigel, explantes de anillos de aorta y un modelo in vivo de isquemia tisular periférica. **Resultados.** Nosotros desarrollamos un procedimiento libre de riesgo xenogénico para la producción de hASC que cumplen con los criterios de la Sociedad Internacional de Citoterapia. Todos los factores detectados con el arreglo de anticuerpos fueron secretados por las hASC en ambas condiciones de producción celular y en ambos pases celulares. Las hASC producidas bajo condiciones xeno-free secretaron mayor concentración de EGF, PDGF-BB, Leptina, IFN- $\gamma$ , CCL1, CCL7, CXCL11, GM-CSF y G-CSF. Las células de séptimo pase producidas bajo condiciones estándar secretaron mayor concentración de algunos factores antineovascularizantes como TIMP-2, angiostatina, CXCL-11 y las formas solubles de Tie-2 y VEGFR3. El MC de las hASC xeno-free tuvo menor capacidad funcional en el ensayo de matrigel, aunque mayor capacidad funcional en los ensayos de anillos de aorta y en el modelo in vivo, que el MC de las células producidas en condiciones estándar. El pase celular se asoció con la reducción de la capacidad neovascularizante de las células producidas bajo condiciones estándar. **Conclusiones.** La producción xeno-free no altera significativamente la capacidad neovascularizante de las hASC, lo cual sugiere que bajo estas condiciones de producción, conservan la capacidad de inducir regeneración tisular. El pase celular se asocia con pérdida significativa de la capacidad neovascularizante de las hASC producidas bajo condiciones estándar.

Palabras Clave:

Células Madre Mesenquimales, Xeno-Free, medios condicionados, angiogénesis

# DEDICATORIA

A Maritza y Samuel:

Ustedes son mi principal motivo, mi mayor aliciente y mi único objetivo

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Orlando Chaparro Garzón, director de la tesis, su constante y paciente orientación, hizo realidad este trabajo y moldearon lo que hoy fundamenta mis expectativas profesionales y mis sueños profesionales.

Al doctorado y sus profesores, cada una de sus enseñanzas y palabras de apoyo nutrieron mis sueños.

A mis compañeras Itali Linero y Lucía Botero. Su tiempo, consejo y orientación tienen un enorme valor para mí.

A la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, su rector el doctor Sergio Augusto Parra y mis compañeros de Ciencias Básicas. Su apoyo y comprensión facilitaron mi avance en el doctorado.

Al doctor Giovanni Montealegre, cirujano plástico, quien me proveyó las muestras humanas para el desarrollo de la tesis.

Al profesor Andrés Pinzón del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, por su orientación en los análisis bioinformáticos.

Al Dr Sang Won Han y la doctora Vivian Samoto, del Centro de Terapia Celular y Molecular de la Universidad Federal de Sao Paulo. Su orientación y tiempo fue indispensable para el desarrollo de los experimentos animales.

Al banco de Sangre de Cordón Umbilical y al Hemocentro distrital, donde se desarrolló una parte importante de los experimentos.

Al laboratorio de Equipos comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, donde se desarrolló una parte importante de los experimentos.

A mi familia, su apoyo y consejo siempre ha marcado mis pasos.

---

## TABLA DE CONTENIDOS

	Pag
<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>V</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	<b>XIV</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>7</b>
1.1. Las células Madre mesenquimales	7
1.2. Mecanismos de regeneración tisular inducidos por las MSC	10
1.1.1. Inmunomodulación	16
1.2. Las MSCs como inductoras de neovascularización	18
1.2.1. La Neovascularización: resultado de arteriogénesis, angiogénesis y/o vasculogénesis	19
<b>2. Justificación y Objetivos</b>	<b>39</b>
2.1. Justificación	39
2.2. Objetivos	42
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>43</b>
3.1. Producción xeno-free de hASC	43
3.1.1. Producción y caracterización del lisado plaquetario humano (hPL)	43
3.1.1.1. Cuantificación de Proteínas en el hPL	43
3.1.2. Extracción de las hASC	44
3.1.2.1. Evaluación de la proliferación celular de las hASC	45
3.1.3. Caracterización de las hASC	45

---

<b>3.1.3.1. Inmunofenotipificación</b>	<b>45</b>
<b>3.1.3.2. Evaluación del potencial de diferenciación de las hASC</b>	<b>47</b>
<b>3.1.4. Criopreservación y descongelación</b>	<b>48</b>
<b>3.2. Recolección del medio condicionado (MC)</b>	<b>49</b>
<b>3.3. Determinación de la concentración relativa de factores neovascularizantes en lisados plaquetarios y medios de cultivo condicionados</b>	<b>49</b>
<b>3.3.1. Análisis de resultados de arreglo de proteínas</b>	<b>52</b>
<b>3.3.2. Análisis bioinformático de los resultados del arreglo de anticuerpos</b>	<b>53</b>
<b>3.4. Caracterización funcional de los Medios condicionados</b>	<b>53</b>
<b>3.4.1. Modelo in vitro de angiogénesis: Ensayo de formación de tubos en Matrigel</b>	<b>54</b>
<b>3.4.2. Modelo ex vivo: Explantes de anillos de aorta</b>	<b>56</b>
<b>3.4.3. Modelo de isquemia tisular periférica (in vivo)</b>	<b>57</b>
<b>3.4.3.1. Cuantificación de la fuerza y masa muscular</b>	<b>59</b>
<b>3.4.3.2. Análisis histológico</b>	<b>60</b>
<b>3.5. Análisis estadístico</b>	<b>60</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>62</b>
<b>4.1. Producción y caracterización de lisado plaquetario humano</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Producción xeno-free de las hASC</b>	<b>67</b>
<b>4.2.1. Extracción y cultivo</b>	<b>68</b>
<b>4.2.2. Caracterización de las Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano</b>	<b>72</b>
<b>4.2.3. Criopreservación</b>	<b>80</b>
<b>4.3. Caracterización cuantitativa, cualitativa y funcional del secretoma neovascularizante de las hASC</b>	<b>81</b>
<b>4.3.1. Caracterización cuantitativa del secretoma neovascularizante de las hASC</b>	<b>81</b>
<b>4.4. Caracterización funcional del secretoma neovascularizante de las hASC</b>	<b>98</b>
<b>4.4.1. Formación de tubos de células endoteliales en Matrigel (modelo in vitro)</b>	<b>98</b>

---

<b>4.4.2. Anillos de aorta (modelo ex vivo)</b>	<b>114</b>
<b>4.4.3. Modelo de isquemia tisular periférica (in vivo)</b>	<b>126</b>
<b>5. Discusión</b>	<b>137</b>
<b>5.1. Consideraciones generales</b>	<b>137</b>
<b>5.2. Producción y caracterización del lisado plaquetario</b>	<b>143</b>
<b>5.3. Producción xeno-free de las Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano</b>	<b>145</b>
<b>5.3.1. Caracterización de las hASC, producidas bajo condiciones xeno-free</b>	<b>148</b>
<b>5.4. Caracterización cualitativa, cuantitativa y funcional del secretoma neovascularizante de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free</b>	<b>150</b>
<b>5.4.1. Caracterización cualitativa y cuantitativa</b>	<b>150</b>
<b>5.4.2. Caracterización funcional de los MCs</b>	<b>158</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>164</b>
<b>7. Recomendaciones</b>	<b>166</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>167</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>191</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ASC</b>	<b>Células Madre derivadas de Tejido Adiposo</b>
<b>BMSC</b>	<b>Células Madre derivadas de Médula Ósea</b>
<b>CFU-F</b>	<b>Unidad Formadoras de Colonias Fibroblásticas</b>
<b>CCL</b>	<b>Quimioquina tipo CC</b>
<b>CCR</b>	<b>Receptor de Quimioquinas</b>
<b>CoM</b>	<b>Medio de cultivo Completo</b>
<b>CXCL</b>	<b>Quimioquina tipo CXC</b>
<b>DMEM</b>	<b>Medio de Eagle modificado por Dulbecco</b>
<b>EPO</b>	<b>Eritropoyetina</b>
<b>EDN-1</b>	<b>Endotelina 1</b>
<b>eNOS</b>	<b>Sintasa endotelial de óxido nítrico</b>
<b>EGF</b>	<b>Factor de crecimiento endotelial</b>
<b>FBS</b>	<b>Suero Fetal Bovino</b>
<b>G-CSF</b>	<b>Factor estimulante de colonias de granulocitos</b>
<b>GM-CSF</b>	<b>Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos</b>
<b>GvHD</b>	<b>Enfermedad de Injerto contra Huésped</b>
<b>HGF</b>	<b>Factor de Crecimiento de Hepatocitos</b>
<b>HIF-1 <math>\alpha</math></b>	<b>Factor 1 <math>\alpha</math> Inducido por Hipoxia</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Interferón <math>\gamma</math></b>
<b>IGF-1</b>	<b>Factor de Crecimiento 1 similar a la Insulina</b>
<b>IL</b>	<b>Interleuquina</b>
<b>iNOS</b>	<b>Sintasa inducible de óxido nítrico</b>
<b>MC</b>	<b>Medio Condicionado</b>
<b>MCP</b>	<b>Proteína quimioatrayente de Monocitos</b>
<b>MHC-I</b>	<b>Complejo Mayor de Histocompatibilidad I</b>
<b>MMP</b>	<b>Metaloproteinasa de la Matriz extracelular</b>

---

<b>MSC</b>	<b>Células Madre Mesenquimales</b>
<b>PDA</b>	<b>Enfermedad Vascul ar Periférica</b>
<b>PDGF</b>	<b>Factor de Crecimiento derivado de plaquetas</b>
<b>PDGFR</b>	<b>Receptor del Factor de Crecimiento derivado de plaquetas</b>
<b>PIGF</b>	<b>factor de crecimiento placentario</b>
<b>RPMI</b>	<b>Medio del Instituto Roswell Park Memorial</b>
<b>TIMP</b>	<b>Inhibidor tisular de Metaloproteinasas</b>
<b>TSEs</b>	<b>Encefalopatías Espongiforme Transmisible</b>
<b>VEGF</b>	<b>Factor de Crecimiento Vascul ar Endotelial</b>
<b>VEGFR</b>	<b>Recetor del Factor de Crecimiento Vascul ar Endotelial (forma soluble)</b>
<b>bFGF</b>	<b>Factor básico de Crecimiento Fibroblástico</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Factor de Crecimiento transformante <math>\beta</math></b>
<b>Tie-2</b>	<b>Segunda isoforma del receptor de angiopoyetinas (forma soluble)</b>
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	<b>Factor de Necrosis Tumoral <math>\alpha</math></b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pag</b>
Figura 1.1 Características de las MSC	6
Figura 1.2. Potenciales mecanismos de regeneración tisular inducidos por las MSC	14
Figura 3.1. Grupos experimentales para el arreglo de anticuerpos	51
Figura 3.2. Grupos experimentales para el ensayo de matrigel	55
Figura 3.3. Elementos constitutivos en una red de capilares formada por células endoteliales sobre una matriz de matrigel	56
Figura 3.4. Grupos experimentales para el modelo animal de isquemia tisular periférica	58
Figura 4.1. Resultados de los arreglos de anticuerpos contra factores angiogénicos humanos en el hPL y el FBS	65
Figura 4.2. Correlación de la concentración relativa (unidades arbitrarias/mg de proteína) de las proteínas estudiadas con el primer arreglo de anticuerpos en las dos muestras de hPL estudiadas	65
Figura 4.3. Flujograma de trabajo para la producción xeno-free de hASC	69
Figura 4.4. Proliferación de las ASC a partir del explante de tejido adiposo	70
Figura 4.5. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC) de cuarto pase	70
Figura 4.6. Proliferación de hASC en monocapa, cultivadas bajo condiciones xeno-free y estándar	71
Figura 4.7. Inmunofenotipificación de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free	74
Figura 4.8. Inmunofenotipificación de las hASC producidas bajo condiciones estándar	75
Figura 4.9. Diferenciación adipogénica de las hASCs	76
Figura 4.10. Diferenciación osteogénica de las hASCs	77
Figura 4.11. Cuantificación de la diferenciación adipogénica y osteogénica de las hASC	78
Figura 4.12. Cuantificación de la diferenciación osteogénica y adipogénica de las hASC	79
Figura 4.13. Concentración relativa de los factores neovascularizantes detectados con el primer arreglo de anticuerpos en los MC de la muestra B	83

---

Figura 4.14. Proteínas que aumentaron su concentración en el secretoma de las hASC de cuarto pase celular en respuesta a la producción bajo condiciones xeno-free	84
Figura 4.15. Cantidad de células recuperadas de cada caja de cultivo después de obtener el MC	87
Figura 4.16. Factores neovascularizantes que aumentaron su concentración relativa (por millón de células) en el MC de las hASC de cuarto pase en respuesta a la producción xeno-free	87
Figura 4.17. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que aumentaron su concentración en el MC de las hASC de cuarto pase producidas en condiciones xeno-free	89
Figura 4.18. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que disminuyeron su concentración en el MC de las hASC de cuarto pase producidas en condiciones xeno-free	90
Figura 4.19. Factores neovascularizantes que aumentaron su concentración relativa (por millón de células) en el MC de las hASC de séptimo pase en respuesta a la producción xeno-free	92
Figura 4.20. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que aumentaron su concentración en el MC de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones xeno-free	93
Figura 4.21. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que disminuyeron su concentración en el MC de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones xeno-free	94
Figura 4.22. Efecto del pase celular en el secretoma de las hASC	95
Figura 4.23. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que aumentaron su concentración en el MC de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar	96
Figura 4.24. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que redujeron su concentración en las hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar	97
Figura 4.25. Progresión de las imágenes obtenidas en la caracterización de los resultados del ensayo de formación de tubos en matrigel	100
Figura 4.26. Imágenes representativas de la reconstrucción de las redes formadas por las células EA.hy926 después de ser cultivadas durante 6 horas en los diferentes medios condicionados	102

---

Figura 4.27. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de nodos (A) y uniones maestras (B), por parte de las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de cuarto pase	103
Figura 4.28. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de nodos por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de séptimo pase	105
Figura 4.29. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de uniones por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de séptimo pase	106
Figura 4.30. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de uniones maestras por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de séptimo pase	106
Figura 4.31. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de segmentos maestros por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de séptimo pase	107
Figura 4.32. Efecto del pase sobre la formación de nodos por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones estándar	108
Figura 4.33. Efecto del pase sobre la formación de uniones por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones estándar	109
Figura 4.34. Efecto del pase sobre la formación de uniones maestras por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones estándar	109
Figura 4.35. Efecto del pase sobre la formación de segmentos maestros (A) y redes (B) por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones estándar	110
Figura 4.36. Efecto del pase sobre la formación de nodos (A) y uniones (B) por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free	111
Figura 4.37. Efecto del pase sobre la formación de uniones maestras (A) y segmentos maestros (B) por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free	112
Figura 4.38. Ejemplos representativos de los explantes de aorta murina cultivados durante 11 días en los diferentes Mcs	115
Figura 4.39. Efecto de la producción xeno-free hasta cuarto pase, sobre la cantidad de brotes angiogénicos generados a partir de explantes de aorta murina	118
Figura 4.40. Efecto de la producción xeno-free hasta séptimo pase sobre la cantidad de brotes angiogénicos generados a partir de explantes de aorta murina	118
Figura 4.41. Efecto del pase celular sobre la cantidad de brotes angiogénicos generados a partir de explantes de aorta murina cultivados en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free (A) y condiciones estándar (B), de cuarto y séptimo pase celular	120
Figura 4.42. Efecto de la producción xeno-free hasta séptimo pase, sobre la cantidad de	

---

ramas (A) y longitud del brote angiogénico (B) formado a partir de explantes de aorta murina cultivados en MC de hASC	121
Figura 4.43. Efecto de la producción xeno-free hasta cuarto pase sobre la cantidad de ramas (A) y longitud (B) de uno de los brotes angiogénicos generados a partir de los anillos de aorta murina cultivados en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free (AXf4 y BXf4) y condiciones estándar (AS4 y BS4)	123
Figura 4.44. Efecto del pase celular de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free sobre la cantidad de ramas (A) y longitud (B) de uno de los brotes angiogénicos desarrollados a partir de anillos de aorta murina	124
Figura 4.45. Efecto del pase celular de las hASC producidas bajo condiciones estándar sobre la cantidad de ramas (A) y longitud (B) de uno de los brotes angiogénicos desarrollados a partir de anillos de aorta murina	125
Figura 4.46. Concentración relativa de los factores neovascularizantes detectados en los medios condicionados de la muestra B con el primer arreglo de anticuerpos	127
Figura 4.47. Fotografías representativas de las extremidades posteriores de ratones de cada grupo experimental	129
Figura 4.48. Imagen de un ratón al que se le retiró la piel de la cara posterior de la pierna intervenida y el glúteo mayor, para exponer el músculo gastrocnemio (cabeza de flecha) y el nervio ciático (flecha), el cual fue estimulado eléctricamente para cuantificar la fuerza del gastrocnemio	130
Figura 4.49. Fuerza del músculo gastrocnemio de la pierna intervenida. Se presenta la fuerza en Newtons, cuantificada en respuesta al estímulo eléctrico	131
Figura 4.50. Masa del músculo gastrocnemio de la pierna intervenida. Se presenta la fuerza en Newtons, cuantificada en respuesta a un estímulo eléctrico	132
Figura 4.51. Tinción de H&E de una muestra del gastrocnemio de un ratón tratado con MC-Xf	133
Figura 4.52. Tinción de H&E de una muestra del gastrocnemio de un ratón no tratado	134
Figura 4.53. Tinción de tricromo de una muestra del gastrocnemio de un ratón no tratado	135
Figura 4.54. Estudio de inmunohistoquímica contra CD31, en el músculo de un ratón tratado con MC-Xf	136

---

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pag</b>
Tabla 1.1. Comparación biológica y funcional de las BMSC y ASC	10
Tabla 1.2. Factores con capacidad pro-neovascularizante	25-26
Tabla 1.3. Factores con capacidad anti-neovascularizante	26
Tabla 3.1. Anticuerpos utilizados para la inmunofenotipificación de las hASC, siguiendo los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Citoterapia	46
Tabla 3.2. Evaluación visual de la isquemia en miembros posteriores de ratón	59
Tabla 4.1. Factores de efecto paracrino involucrados en la regulación de la neovascularización, detectados con el arreglo de anticuerpos Human Angiogenesis Antibody Array C1000	64
Tabla 4.2. Concentración relativa de los factores angiogénicos detectados en el hPL con el Human Angiogenesis Antibody Array	66
Tabla 4.3. Viabilidad celular de hASC criopreservadas durante al menos cuatro semanas bajo condiciones xeno-free y estándar	80
Tabla 4.4. Concentración relativa promedio, de los factores angiogénicos detectados en los MC-S4 de ambas muestras con el Human Angiogenesis Antibody Array	83
Tabla 4.5. Análisis estadístico (valor de p) de la disminución de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC xeno-free de cuarto pase	106
Tabla 4.6. Análisis estadístico (valor de p) de la disminución de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC xeno-free de séptimo pase	107
Tabla 4.7. Análisis estadístico (valor de p) de la disminución de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar	110
Tabla 4.8. Análisis estadístico (valor de p) del aumento de la cantidad de brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC de hASC producidas en condiciones xeno-free	117
Tabla 4.9. Análisis estadístico (valor de p) del aumento de la longitud y la cantidad de ramas de uno de los brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC de hASC de séptimo pase producidas en condiciones xeno-free	119
Tabla 4.10. Análisis estadístico (valor de p) de la reducción en la longitud y la cantidad de ramas de uno de los brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC-S de hASC de séptimo pase, frente a MC-S de hASC de cuarto pase	122

---

Tabla 4.11. Clasificación de los resultados del seguimiento fotográfico de los ratones incluidos en los grupos experimentales	129
Tabla 4.12. Análisis estadístico (valor de p) de las diferencias entre los grupos experimentales del modelo animal isquemia tisular periférica	130
Tabla 5.1. Consolidado de las variaciones detectadas en el secretoma neovascularizante de las hASC de cuarto y séptimo pase celular, producidas bajo condiciones xeno-free frente a las hASC producidas bajo condiciones estándar	158
Tabla 5.2. Consolidado de los análisis bioinformáticos del efecto de la producción xeno-free y el pase celular sobre el secretoma neovascularizante de las hASC	162



## ÍNDICE DE ANEXOS

		<b>Pag</b>
Anexo 1	Formato de consentimiento informado	191
Anexo 2	Artículo Original	193

# INTRODUCCIÓN

Las MSC son consideradas una de las alternativas terapéuticas de mayor potencial para la medicina regenerativa teniendo en cuenta su capacidad de inducir regeneración tisular, además de su relativa facilidad de extracción, cultivo, caracterización, criopreservación y aplicación (Phinney, et al., 2007, Prockop, 2009). Estas células también son relativamente estables fenotípica y genotípicamente en cultivo *in vitro*, pueden ser extraídas de diferentes tejidos (da Silva Meirelles, et al., 2006), y pueden obtenerse en cantidades relativamente abundantes de fuentes como el tejido adiposo (Aust, et al., 2004), lo cual facilita el acceso a ellas y viabiliza su uso como tratamiento autólogo (Zuk, 2010).

La producción (extracción, cultivo *in vitro* y criopreservación) de MSCs, tiene como objetivo la obtención de un número suficiente de células (usualmente millones de ellas) para su aplicación terapéutica, buscando garantizar la menor variabilidad fenotípica posible. La producción de MSCs implica su manipulación sustancial y por lo tanto, definir las condiciones óptimas bajo las cuales debe desarrollarse, es uno de los requisitos de indispensable cumplimiento para la viabilización de las MSC como alternativa terapéutica para seres humanos (Bieback, et al., 2011, Jonsdottir-Buch, et al., 2013).

Los protocolos actuales de producción de MSC para su aplicación en seres humanos con fines terapéuticos, consideran el uso de compuestos de origen xenogénico (animal o

bacteriano). El uso de estas sustancias son una limitación importante para el uso de las MSC como alternativa terapéutica para seres humanos, considerando los riesgos que existe de rechazo inmunológico contra las moléculas que los componen, sin considerar el riesgo de transmisión de zoonosis (Bieback, et al., 2011).

No existe un procedimiento ordenado, secuencial y potencialmente escalable para la producción xeno-free de hASC. La extracción de ASC tradicionalmente se ha fundamentado en la digestión de la matriz extracelular del tejido adiposo con una colagenasa de origen bacteriano. Ya se han reportado protocolos para la extracción de las ASC mediante explante (Beltran, 2007, Jing, et al., 2011, Linero, et al., 2014b), o disgregación mecánica del tejido (Baptista, et al., 2009, Bianchi, et al., 2013), lo cual elimina la necesidad del uso de la enzima.

El cultivo in vitro de las MSC requiere el uso de medios estándar de cultivo celular (como *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM; o *Roswell Park Memorial Institute*, RPMI) suplementados usualmente, con mezclas complejas de nutrientes como el Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS). Además del riesgo de rechazo inmunológico (Martin, et al., 2005, Sundin, et al., 2007) y la transmisión de zoonosis (Tekkotte, et al., 2011), el FBS ha demostrado sustancial variabilidad de lote a lote y cada vez existen mayores inquietudes éticas respecto al procedimiento de su obtención ((CHMP), 2013).

Se han planteado diferentes alternativas para la sustitución del FBS, incluyendo el Lisado Plaquetario Humano (*Human Platelet lysate*, hPL) y algunas otras que incluso ya están

disponibles comercialmente. El hPL no solamente carece de los riesgos descritos del FBS, también es más económico (Fekete, et al., 2012b, Kinzebach, et al., 2013) y garantiza la viabilidad y proliferación de las MSC, preservando su fenotipo celular (Doucet, et al., 2005, Schallmoser, et al., 2007).

Tal vez el único inconveniente que se ha evidenciado con el uso del hPL como sustituto del FBS, es la formación de coágulos de fibrinógeno en el cultivo celular. Esta dificultad se ha tratado de superar con la adición de heparina al medio de cultivo, sin embargo este anticoagulante tiene efectos deletéreos sobre las MSC, evidenciados al menos en la reducción de su proliferación (Hemeda, et al., 2013), aumento del tamaño y desarrollo de senescencia (Ling, et al., 2015), lo cual incluso podría afectar las células durante su criopreservación.

En el presente trabajo documentamos un protocolo xeno-free para la producción de hASC, fundamentado en el uso de hPL sin la adición de anticoagulantes, con lo cual se configura un proceso que puede ser implementado en la extracción, cultivo y criopreservación de células, de forma tal que pueden producirse hASC seguras para su aplicación en seres humanos.

Tradicionalmente se ha propuesto que las MSC inducen la regeneración tisular, gracias a su capacidad de proliferación y diferenciación, lo cual les permitiría reemplazar las células perdidas en diferentes condiciones patológicas, reestructurando así el tejido dañado (Phinney, et al., 2007). Aunque el trasplante de MSC ha demostrado inducir regeneración

de diferentes tipos de tejidos incluyendo piel (Maxson, et al., 2012), hueso (Grayson, et al., 2015) y miocárdico (Sanganalmath, et al., 2013), no se ha demostrado que este resultado dependa de la sustitución de las células perdidas con MSC diferenciadas hacia el linaje celular del tejido neoformado (Prockop, 2007).

Se ha sugerido que la regeneración tisular inducida por las MSC, sea resultado al menos en parte, del efecto trófico de factores paracrinos liberados por ellas (Caplan, et al., 2011, Gnecci, et al., 2008, Liang, et al., 2014), y particularmente aquellos con capacidad pro-neovascularizante (Gnecci, et al., 2012). Incluso, se ha reportado que el medio condicionado (MC, medio de cultivo enriquecido con las moléculas liberadas por las células) por las MSC, favorece la regeneración de músculo esquelético (Pereira, et al., 2014), pulmón (Goolaerts, et al., 2014), sistema nervioso (Cantinieux, et al., 2013) y hueso (Linero, et al., 2014a), con una eficiencia al menos similar a las MSC en sí.

Diferentes grupos de investigación, incluyendo el nuestro (Linero, et al., 2014a, Restrepo-Jimenez, 2009), han prestado atención al repertorio de moléculas secretadas (secretoma) por las MSC (Gnecci, et al., 2008, Lavoie, et al., 2013, Liang, et al., 2014). Se conocen descripciones cuantitativas y funcionales de moléculas de variada índole involucradas en la regulación de procesos relacionados con la regeneración tisular incluyendo la respuesta inflamatoria, fibrosis, proliferación y apoptosis, migración y diferenciación celular, además de neovascularización (Bieback, et al., 2009, Kupcova Skalnikova, 2013, Lavoie, et al., 2013, Liang, et al., 2014, Maxson, et al., 2012).

La capacidad neovascularizante es uno de los principales atractivos terapéuticos de las MSC. La neovascularización no solamente es una meta terapéutica en el manejo de algunas de las más importantes enfermedades a nivel mundial, incluyendo a los cuadros degenerativos post-isquémicos y la enfermedad vascular periférica (*peripheral arterial disease*, PAD). Es un requisito para el correcto cierre de heridas y la regeneración tisular (excepto del cartílago), toda vez que el límite de difusión de nutrientes y oxígeno no supera los 2 mm alrededor de un capilar específico (Griffith, et al., 2005), lo cual restringe el tamaño de los tejidos regenerables (Rouwkema, et al., 2008).

Caracterizar el secretoma neovascularizante de las hASC producidas en condiciones xeno-free, brindaría información respecto al efecto fenotípico que la producción en estas condiciones tiene sobre las MSC, además de otorgar información respecto a la capacidad de inducir la regeneración tisular que podrían tener las células producidas bajo estas condiciones.

El pase celular tiene una relación inversa con el potencial de proliferación (Wu, et al., 2014) y diferenciación de las MSC (Di Battista, et al., 2014), lo cual se ha interpretado como la pérdida paulatina de su calidad de “célula madre”. Tradicionalmente se ha considerado que la expansión *in vitro* hasta alcanzar el cuarto pase celular, es el momento en el que regularmente se obtiene un número suficiente de células para ser trasplantadas, conservando las características que las hacen atractivas terapéuticamente. De otro lado, se ha sugerido que una población de MSCs de séptimo pase, está compuesta por células

que ya han perdido su atractivo terapéutico e incluso se encuentran desarrollando un fenotipo senescente.

En este trabajo se pretende caracterizar cualitativa, cuantitativa y funcionalmente el secretoma neovascularizante de las hASC producidas en condiciones xeno-free y las diferencias que existen al respecto, entre las células de cuarto y séptimo pase.

---

# 1. REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1. LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las MSC son células con capacidad de proliferación y diferenciación a linajes celulares mesodérmicos y no mesodérmicos, incluyendo el condrogénico, osteogénico, miogénico y adipogénico (Bianco, et al., 2008). Tradicionalmente han sido reconocidas por su capacidad de adherencia al plástico, su aspecto fibroblastoide al microscopio, su potencial de diferenciación in vitro y la expresión de un inmunofenotipo caracterizado por la expresión de marcadores como CD73, CD90 y CD105, en ausencia de expresión de marcadores de linaje hematopoyético como CD34 y CD45 (Dominici, et al., 2006).

En la década de los 70s, fueron identificadas como una población celular escasa de la médula ósea (*Bone Marrow Stem Cells, BMSC*) (Phinney, 2002), pero pueden ser aisladas de diferentes tejidos incluyendo sangre de cordón umbilical y tejido adiposo (*Adipose Stem Cells, ASC*) (da Silva Meirelles, et al., 2006, Romanov, et al., 2003) (Fig. 1).

Las BMSC y ASC tienen capacidad de proliferación y diferenciación comparable (Kern, et al., 2006, Peng, et al., 2008, Wagner, et al., 2005), sin embargo las ASC tienen ciertas características que las hacen más atractivas que las BMSC, para aplicaciones terapéuticas.



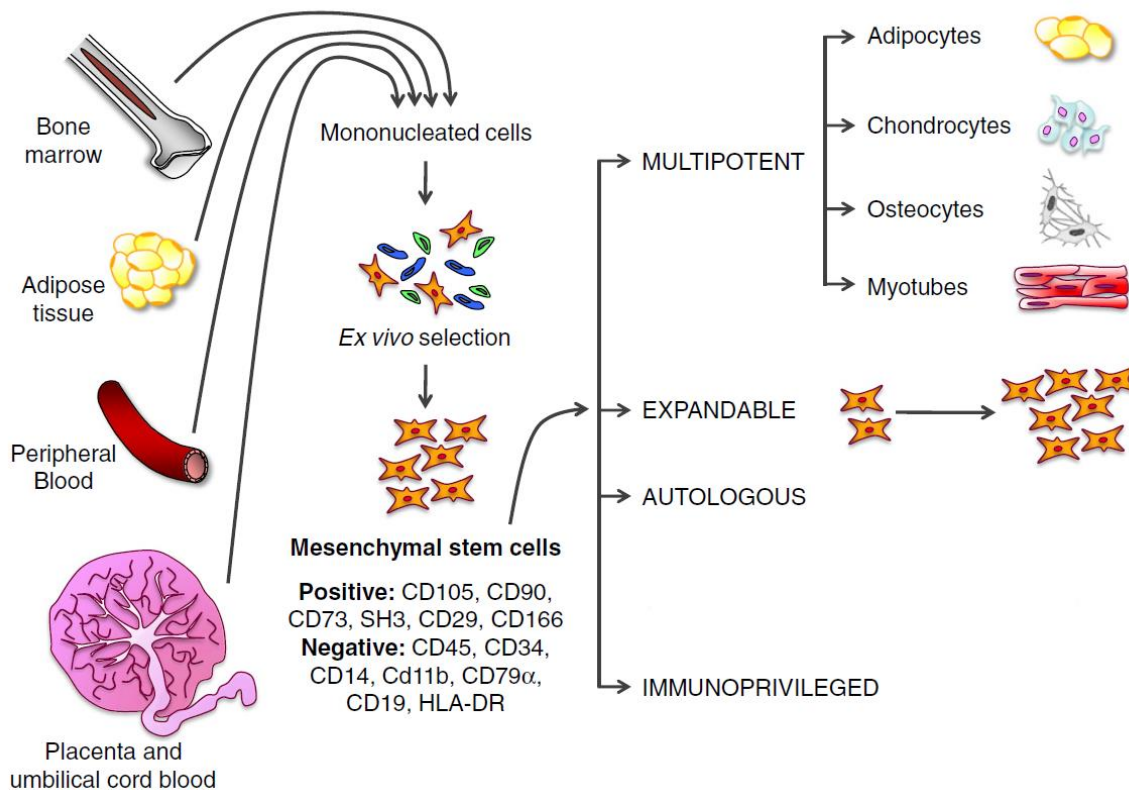


Figura 1.1. Características de las MSC. Las MSC son células con capacidad de proliferación y diferenciación hacia linajes de origen mesodérmico y no mesodérmico, que pueden extraerse de diferentes tejidos incluyendo médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica, tejido placentario y sangre de cordón umbilical. Además de su potencial de proliferación y diferenciación, son reconocidas por un inmunofenotipo caracterizado por la expresión de marcadores como CD73, CD90 y CD105, en ausencia de la expresión de marcadores de linaje hematopoyético incluyendo CD34 y CD45, entre otros. Las MSC también han sido reconocidas como células immuno-privilegiadas por presentar escasa expresión de los sistemas HLA-DR y carecer de expresión de péptidos coestimuladores como CD40, CD80 o CD86, todo lo anterior, las convierte en una atractiva alternativa de terapia celular autóloga. Modificado de Gnecci M, et al. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol.* 2012 Aug 19; 57 (1):48-55

En cultivo tienen mayor estabilidad morfológica y genética (Izadpanah, et al., 2006), menor tasa de senescencia (Kern, et al., 2006) y conservan su multipotencialidad durante más tiempo que las BMSC (Izadpanah, et al., 2006), e incluso se ha sugerido que favorecen la hematopoyesis con mayor eficiencia que las BMSC (De Toni, et al., 2011).

De otra parte, es mucho mayor la cantidad de MSC que puede extraerse de una muestra primaria de tejido adiposo que de una de médula ósea (Aust, et al., 2004). Las MSC son muy escasas en la médula ósea (1/100000 aproximadamente) (Mizuno, et al., 2012) lo cual lleva a que se obtengan 100 a 1000 unidades formadoras de colonias (*colony forming units*, CFU-F) por mL de médula ósea (Strem, et al., 2005). En el tejido adiposo, las MSC equivalen al cerca del 2% de las células nucleadas, lo cual se correlaciona con que se obtienen aproximadamente 5000 CFU-Fs de cada mL de tejido adiposo (Mizuno, et al., 2012), mientras que otros han reportado la obtención de alrededor de  $5 \times 10^5$  ASC por mL o gramo de tejido adiposo (Aust, et al., 2004). Todo lo anterior además, se ve potenciado con el hecho de que solo pueden obtenerse unos cuantos mL de la médula ósea, mientras que son cientos de mL los que rutinariamente pueden obtenerse de tejido adiposo (Tab. 1.1).

TABLA 1.1. COMPARACIÓN BIOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LAS BMSC Y ASC

Característica	Comentario	Fuente
Inmunofenotipo	No hay diferencias importantes	(Appasani, et al., 2011, Strem, et al., 2005)
Potencial de proliferación y diferenciación	Similares, con tendencia a ser mayor el de las ASC	(Wagner, et al., 2005) (Kern, et al., 2006) (Peng, et al., 2008)
Senescencia	Mayor en las BMSC	(Kern, et al., 2006)
Conservación de la multipotencialidad in vitro	Mayor en las ASC	(Izadpanah, et al., 2006)
Proporción de las MSC en la muestra primaria	5 a 50 veces superior en tejido adiposo	(Strem, et al., 2005) (Mizuno, et al., 2012)

## 1.2. MECANISMOS DE REGENERACIÓN TISULAR INDUCIDOS POR PARTE DE LAS MSC

La medicina regenerativa es el campo de las ciencias médicas focalizado en el restablecimiento, mantenimiento o mejoramiento de estructuras y/o funciones corporales mediante la implementación de alternativas terapéuticas como el trasplante de células y/o sus derivados (Appasani, et al., 2011, van den Bos, et al., 2013). Aunque los resultados alcanzados a la fecha con los ensayos de terapia celular son cuando menos alentadores, sigue siendo un campo en pleno desarrollo, que carece de respuestas para algunas de las principales preguntas de su ejercicio (van den Bos, et al., 2013).

La degeneración tisular es una condición progresiva e irreversible, caracterizada por la alteración estructural y funcional de un tejido, consecuencia de la disfunción celular, que a su vez es causada por condiciones como la alteración vascular que lleva a hipoxia e isquemia. Este proceso es el fundamento fisiopatológico de algunos de los trastornos de

mayor impacto en la morbilidad mundial, y la regeneración de los tejidos perdidos en estos procesos patológicos es el principal frente de trabajo de la medicina regenerativa.

Las MSC han demostrado poseer la capacidad de favorecer la regeneración de tisular en modelos clínicos y preclínicos, lo cual no solo ha sostenido el interés de la comunidad científica mundial hacia ellas, sino que además lo ha aumentado. Prueba de ello, es el permanente aumento de la cantidad de ensayos clínicos en los cuales se evalúa la regeneración tisular con MSC proponiéndolas como alternativa terapéutica para algunos de los problemas de salud más importantes a nivel mundial (Squillaro, et al., 2015), incluyendo enfermedades neurodegenerativas (Chang, et al., 2014), diabetes (Paek, et al., 2014), enfermedades cardiovasculares (Abdel-Latif, et al., 2007, Boudoulas, et al., 2009, Gnechi, et al., 2012, Herrmann, et al., 2009, Jadczyk, et al., 2013) e inflamatorias como la artritis (Swart, et al., 2014).

Aunque se ha evidenciado que las MSC favorecen la regeneración de diferentes tipos de tejido, incluyendo miocardio (Gnechi, et al., 2012), médula espinal (Zhou, et al., 2013) y estructuras osteoarticulares (Chen, et al., 2008, Chung, et al., 2008, Krampera, et al., 2006b); no se ha demostrado que los tejidos neoformados estén compuestos por una cantidad significativa de MSC que se hubieran diferenciado hacia el linaje tisular del tejido receptor después de haber sido trasplantadas, lo cual sugiere que estas nuevas estructuras están compuestas por células locales reclutadas y moduladas en respuesta al

trasplante de las MSC (Gnecchi, et al., 2008, Linero, et al., 2014a, Phinney, et al., 2007, Prockop, 2009).

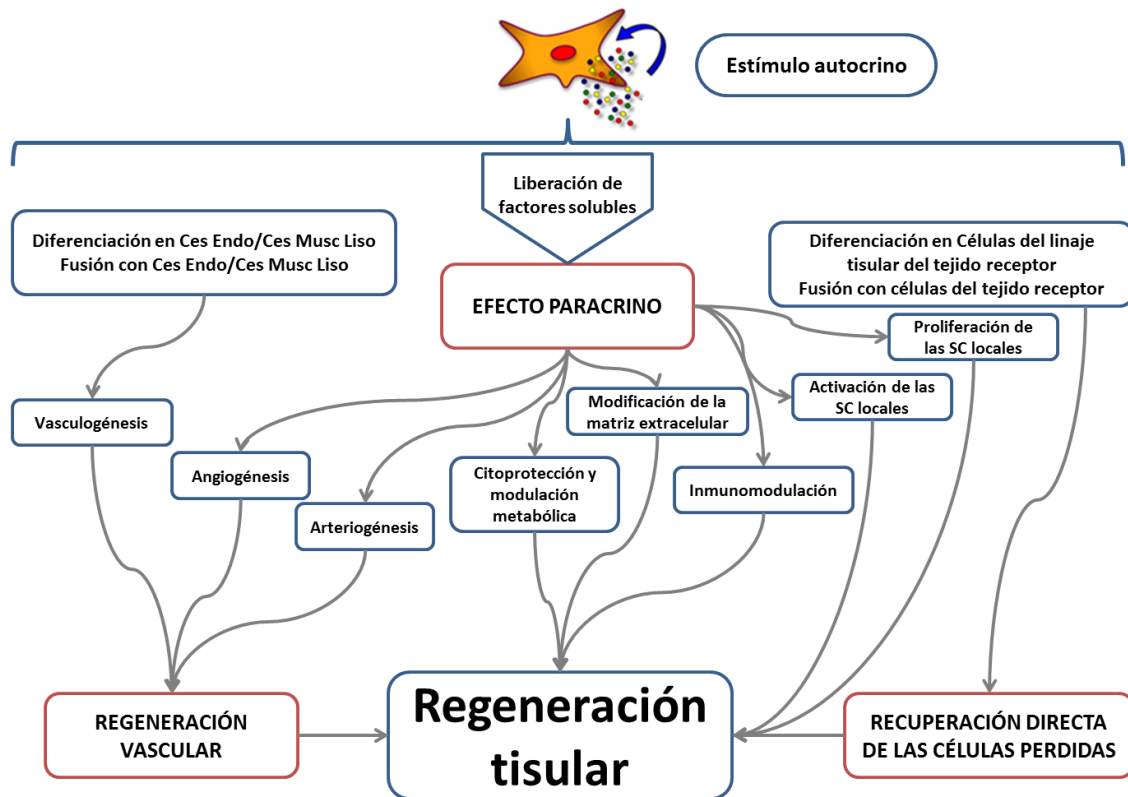
Por ejemplo, aunque se han obtenido resultados alentadores en los ensayos de regeneración miocárdica (Herrmann, et al., 2009), la mejoría clínica aparece incluso dentro de las 72 horas posteriores al trasplante de las MSC, tiempo claramente insuficiente para que alcanzaran a diferenciarse hacia linaje cardiomiogénico las MSC que se hubieran logrado anclarse en el miocardio (Gnecchi, et al., 2006).

De otra parte, la regeneración tisular evidenciada tras su aplicación, no ha podido correlacionarse con la permanencia de las MSC trasplantadas, incluso tras aplicaciones directas en el tejido lesionado (Linero, et al., 2014a, Toma, et al., 2002). Se sabe que inmediatamente después de su aplicación sistémica, una importante proporción de las células aplicadas (>80%) se acumulan en los capilares pulmonares (Muller-Ehmsen, et al., 2006) y una escasa proporción de ellas se distribuye en otros tejidos, con predilección por tejidos lesionados (Kidd, et al., 2009). Sin embargo, la inmensa mayoría de ellas son eliminadas dentro de las siguientes 24h (Muller-Ehmsen, et al., 2006) y aunque la recuperación funcional ha sido sistemáticamente reportada, solo una proporción de las células que permanecen ancladas al tejido regenerado, llega a expresar marcadores de diferenciación específicos (Toma, et al., 2002), lo cual reduce la posibilidad de que el resultado se deba a la sustitución de las células perdidas y sugiere otros mecanismos de acción (Gnecchi, et al., 2005, Linero, et al., 2014a).

Es pues evidente que las MSC poseen la capacidad de inducir la regeneración tisular, sin embargo el mecanismo parece depender de un mecanismo alterno a la sustitución de las células perdidas.

La localización perivascular que se ha sugerido para las MSC (Crisan, et al., 2008), y la demostración de un amplio espectro funcional por parte del grupo de factores tróficos de efecto paracrino liberados por ellas, ha servido para sugerir una base paracrina de su capacidad de favorecer la regeneración tisular en modelos de terapia regenerativa con estas células (Caplan, et al., 2011, Caplan, et al., 2006, Caplan, et al., 2015).

Diferentes grupos de investigación, incluyendo el nuestro (Beltran, 2007, Restrepo-Jimenez, 2009), han prestado atención al secretoma de las MSC. El perfil funcional del secretoma de las MSC es muy amplio e incluye moléculas involucradas con la regulación de procesos necesarios para la correcta regeneración tisular, incluyendo procesos celulares y procesos sistémicos.



**Figura 1.2. Potenciales mecanismos de regeneración tisular inducidos por las MSC.** Por su capacidad de diferenciación hacia linaje endotelial y de células musculares lisas, las MSC podrían inducir la regeneración tisular en la formación de redes vasculares mediante la vasculogénesis, diferenciándose hacia los linajes celulares mencionados e integrándose en los vasos sanguíneos neoformados. Su capacidad de diferenciación hacia linajes como el osteogénico o cardiomiogénico, podría permitirles sustituir células perdidas de diferentes tejidos, por lo cual podrían integrarse en los tejidos neoformados. Finalmente, mediante efectos paracrinos, además de autoestimularse (efecto autocrino), estas células podrían activar las células madre locales (induciendo su proliferación y diferenciación), modular la respuesta inmune local y por ende la inflamación, modificar la matriz extracelular (liberando enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas), activar mecanismos de citoprotección y modulación metabólica (particularmente importantes para la regeneración miocárdica), o activar la angiogénesis, arteriogénesis o ambas, mediante la inducción de proliferación y migración de células endoteliales y células de músculo liso vascular, respectivamente. Modificado de Gnechi M, et al. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol.* 2012 Aug 19;57(1):48-55.

Dentro de los procesos celulares regulados por el secretoma de estas células, vale la pena resaltar la migración, proliferación diferenciación y supervivencia celular (Kupcova Skalnikova, 2013, Lavoie, et al., 2013), además de la modulación metabólica y citoprotección de las células expuestas al daño (Gnecchi, et al., 2005) al igual que otros procesos complejos como la neovascularización, respuesta inflamatoria y la fibrosis (Bieback, et al., 2009, Kupcova Skalnikova, 2013, Lavoie, et al., 2013, Liang, et al., 2014, Maxson, et al., 2012), además de la modificación de la matriz extracelular gracias a la producción de metaloproteinasas, inmunomodulación y estímulo a las células madre locales (Hatzistergos, et al., 2010).

Estas descripciones han puesto en consideración la capacidad funcional del secretoma de las MSC como uno de los factores relacionados con su capacidad regenerativa, lo cual además se ha confirmado en condiciones experimentales (Phinney, et al., 2007, Prockop, 2007, Prockop, 2009). La regeneración inducida tras el trasplante de las células se ha podido reproducir al usar los medios de cultivo condicionados por ellas (Cantinieaux, et al., 2013, Goolaerts, et al., 2014, Linero, et al., 2014a, Pereira, et al., 2014), y además se ha logrado suprimir este resultado al bloquear el efecto de alguno de los factores detectados en el secretoma de las MSC (Gnecchi, et al., 2005, Gnecchi, et al., 2006), incluyendo aquellos directamente relacionados con la regulación de la neovascularización como el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (*basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF), el



factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento de hepatocitos (*hepatocytes growth factor*, HGF), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*Insuline like Growth Factor 1*, IGF-1), eritropoyetina (erythropoietin, EPO), la endotelina 1 (*endothelin 1*, EDN-1) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumoral necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) (Kinnaird, et al., 2004b, Maltais, et al., 2010, Shabbir, et al., 2009, Uemura, et al., 2006).

Hoy se acepta que la regeneración tisular inducida por las MSC es resultado de diferentes mecanismos, uno de los cuales es la capacidad funcional de los factores que hacen parte de sus secretoma y de esa forma regulan el funcionamiento de procesos como el funcionamiento de las células madre locales, la respuesta inflamatoria, la modificación de la matriz extracelular, la modulación metabólica y citoprotección de las células expuestas a estímulos nocivos y la neovascularización (Fig. 1.2)

#### **1.2.1. INMUNO-MODULACIÓN:**

Tradicionalmente las MSC han sido reconocidas por su baja inmunogenicidad, considerando su escasa expresión de los péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II o DR (major histocompatibility complex II, MHC II) y la ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 (Le Blanc, et al., 2003).

Sin embargo, estas células también tienen la capacidad de modular el funcionamiento del sistema inmune induciendo o reprimiendo su actividad, lo cual se ha pretendido aprovechar ensayándolas como alternativa terapéutica para el manejo de trastornos de etiopatogenia inmunológica como la enfermedad de injerto contra huésped (*graft versus-host disease*, GvHD), la esclerosis múltiple o el rechazo al trasplante de órgano (Parekkadan, et al., 2010). No obstante, también se ha podido documentar la relación que existe entre las capacidades inmunoregulatorias de las MSC y la activación de otros procesos biológicos indispensables para la regeneración tisular como la neovascularización (Muscari, et al., 2013), lo cual se ha correlacionado con la regeneración post-isquémica de tejidos como el miocardio (Dayan, et al., 2011) o la médula espinal (Nakajima, et al., 2012).

Las interacciones de las MSC con el sistema inmune parecen ser muy complejas y sus resultados tienen implicaciones en diferentes linajes celulares del sistema inmune innato y adaptativo. Por ejemplo, las MSC modifican el funcionamiento del sistema inmune innato reprimiendo la proliferación de células asesinas naturales en reposo (Spaggiari, et al., 2008), también reprimen la maduración de las células dendríticas, mediante la liberación de IL-6 y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor, GM-CSF) (Nauta, et al., 2006), y favorecen la generación de macrófagos M2 (resolutivos) en lugar de M1 (pro-inflamatorios) gracias a la liberación de IL-4 e IL-13, lo cual ha sido identificado como un fenómeno asociado a la correcta regeneración tisular (Nakajima, et al., 2012).

También se ha demostrado que las MSC regulan el funcionamiento de las células del sistema inmune adaptativo. Por ejemplo se sabe que las MSC reprimen la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+, además de inducir la proliferación de células T regulatorias (Krampera, et al., 2006a), lo cual además se ha asociado con su capacidad inmunosupresora sobre linfocitos T citotóxicos (Prevosto, et al., 2007, Rasmusson, et al., 2007)

### 1.3. LAS MSC COMO INDUCTORA DE NEOVASCULARIZACIÓN

Reconociendo la neovascularización (resultado de la angiogénesis, arteriogenesis y/o vasculogénesis) como un proceso indispensable para la supervivencia y funcionamiento tisular, es lógico comprender que se asocie la capacidad pro-neovascularizante de las MSC con su capacidad de inducir la regeneración tisular.

Ya se ha documentado la diferenciación de las MSC hacia linaje endotelial (Gupta, et al., 2014, Janeczek Portalska, et al., 2012, Planat-Benard, et al., 2004), y se ha demostrado que las MSC trasplantadas hacen parte de la estructura de capilares neoformados (Cao, et al., 2005), sin embargo la cantidad de células diferenciadas no guarda relación con la red capilar neoformada (Cao, et al., 2005), lo cual ha favorecido la idea de que la capacidad neovascularizante de las MSC tenga relación principalmente con la actividad de factores de efecto paracrino liberados por ellas (Gnecchi, et al., 2012), o una combinación de estas dos actividades (Boomsma, et al., 2012, Caplan, 2007, Caplan, et al., 2006, Restrepo-Jimenez, 2009).

Son diferentes los niveles de evidencia que sugieren un mecanismo paracrino en la inducción de la neovascularización por parte de las MSC. Estas células secretan una amplia variedad de factores tróficos relacionados con la regulación de la vasculogénesis, arteriogénesis y la angiogénesis, como CCL2, VEGF, bFGF, IGF-1, TGF- $\beta$ , además de angiopoyetina, PDGF y PlGF (Boomsma, et al., 2012, Hsiao, et al., 2012, Kupcova Skalnikova, 2013, Restrepo-Jimenez, 2009), y se ha logrado suprimir la regeneración favorecida por las MSC o sus MCs, al bloquear el efecto de alguno de estos factores (Gnecchi, et al., 2005, Gnecchi, et al., 2006, Hung, et al., 2007, Kinnaird, et al., 2004b), incluyendo aquellos directamente relacionados con la regulación de la neovascularización como VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , HGF, IGF-1, EPO, EDN-1 y FNT- $\alpha$  (Kinnaird, et al., 2004b, Maltais, et al., 2010, Shabbir, et al., 2009, Uemura, et al., 2006).

Puede concluirse pues, que existe abundante evidencia que asocia la capacidad pro-neovascularizante de las MSC, con su capacidad inductora de regeneración tisular, lo cual ha sido corroborado por diferentes grupos a nivel mundial mediante diferentes modelos experimentales.

### **1.3.1. LA NEOVASCULARIZACIÓN: RESULTADO DE ARTERIOGÉNESIS, ANGIOGÉNESIS Y/O VASCULOGÉNESIS**

La falla vascular es uno de los principales factores etiopatogénicos de la morbimortalidad mundial. Según el último reporte de la Asociación Americana del Corazón (AHA), la mortalidad por enfermedad cardiovascular en EEUU durante el 2011 fue de 109,2 por 10<sup>5</sup> habitantes, lo cual equivale a que más de 2100 estadounidenses murieron al día por esta

causa. De otra parte, alrededor de 8,5 millones de norteamericanos mayores de 40 años sufre de PAD (202 millones en el mundo), con una mortalidad cercana a 20 por 10<sup>5</sup> (Mozaffarian, et al., 2014)

Cerca del 40% de los pacientes con falla cardíaca muere durante el primer año después de haber sido diagnosticado (Mozaffarian, et al., 2014), y se ha calculado que aproximadamente cada 34 segundos un estadounidense sufre un evento coronario y cada minuto alguien perece por causas cardíacas (Da Ines, et al., 2013)

La formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) es un requisito de la correcta regeneración de tisular, toda vez que la viabilidad celular por difusión de nutrientes solo es viable en un radio de 2 mm (Griffith, et al., 2005), lo cual limita el tamaño de los tejidos trasplantados (Rouwkema, et al., 2008).

La neovascularización puede ser resultado de angiogénesis, arteriogénesis, vasculogénesis o una combinación de ellas (Heil, et al., 2006). Su disfunción tiene una asociación estrecha con la fisiopatología de enfermedades como el cáncer, retinopatía diabética y artritis reumatoide (Otrock, et al., 2007), y su correcto funcionamiento es indispensable para el cierre de heridas o la adecuada regeneración de tejidos vascularizados como hueso, músculo, piel, sistema nervioso y sistema cardiovascular (Caplan, et al., 2006).

Aunque no se conocen en detalle los procesos, las células y moléculas involucradas en el desarrollo de estos tres mecanismos de neovascularización, el conocimiento actual

permite reconocer algunos de los factores de efecto paracrino involucrados en su regulación, lo cual puede usarse para la identificación de posibles alternativas para la inducción de la neovascularización como opción terapéutica en enfermedades degenerativas post-isquémicas (Tab. 1.2 y 1.3).

Con el nombre de vasculogénesis se ha reconocido la formación de una red vascular surgida mediante la proliferación y diferenciación de células precursoras indiferenciadas, principalmente Hemangioblastos (Drake, 2003). La vasculogénesis tiene particular importancia durante el desarrollo embrionario, aunque también tiene relación con la correcta regeneración de tejidos adultos, incluyendo la cicatrización, y la fisiopatología de trastornos neoplásicos (Ribatti, et al., 2001). No es muy claro el mecanismo por el cual se desarrolla la vasculogénesis en tejidos adultos, sin embargo se ha sugerido que la señal de VEGF guarde relación directa con la regulación de este proceso (Schmidt, et al., 2007).

Con el nombre de arteriogénesis se designa el engrosamiento y alargamiento de arteriolas, en respuesta al estrés físico por aumento en el flujo sanguíneo local, ocasionado por ejemplo, por la obstrucción de un vaso en anastomosis arterio-arteriolas pre-existentes (Heil, et al., 2006, Scholz, et al., 2001), mientras que como angiogénesis se reconoce el proceso de formación de un nuevo lecho capilar, a partir de uno previamente existente, en respuesta al estímulo hipóxico que lleva a la activación del factor inducido por hipoxia 1 alfa, (*Hipoxia Inducible Factor 1-alpha, HIF-1 $\alpha$* ) es el elemento central del desarrollo de la angiogénesis (Pugh, et al., 2003).

Aunque la arteriogénesis y la angiogénesis comparten mecanismos de desarrollo, tienen algunas diferencias importantes. La hipoxia como estímulo estabilizante y activador del factor inducido por hipoxia 1 alfa, (*Hipoxia Inducible Factor 1-alpha, HIF-1 $\alpha$* ) es el elemento central del desarrollo de la angiogénesis (Pugh, et al., 2003), mientras que la arteriogénesis se desarrolla en normoxia y depende esencialmente del cambio de flujo sanguíneo ocasionado por la oclusión vascular (Pipp, et al., 2004). De otra parte, la angiogénesis tiene como resultado el desarrollo de un nuevo lecho capilar, mientras que el resultado de la arteriogénesis es la producción de nuevas arterias, reemplazando alguna que previamente haya sido obstruida (Cai, et al., 2008).

En la génesis de la arteriogénesis, se ha propuesto que como respuesta al estrés hemodinámico ocasionado por la oclusión vascular, la célula endotelial produce óxido nítrico, lo cual lleva a la relajación del músculo liso y por lo tanto vasodilatación (Pipp, et al., 2004) que se verá seguida de la proliferación, migración y reorganización de la capa de músculo liso. Este mecanismo ha sido soportado por la demostración de la indispensabilidad de la sintasa endotelial de óxido nítrico (*endotelial Nitric Oxide Syntase, eNOS*) para el correcto desarrollo de la arteriogénesis (Troidl, et al., 2010).

La migración, proliferación y reorganización de células endoteliales y células de músculo liso (procesos indispensables en el desarrollo de la arteriogénesis), dependería de la actividad de un factor mitogénico. Aunque no se conoce el mecanismo por el cual el estrés hemodinámico ocasiona su producción, se ha sugerido que la proteína quimio-atrayente 1

de monocitos (*Monocyte Chemoattract Protein 1*, MCP-1, hoy denominada CCL2) podría ser el candidato más plausible de ser el involucrado en inducción inicial de estos tres procesos celulares (Troidl, et al., 2012).

CCL2 es una quimioquina de la familia C-C, producida por diferentes tipos celulares (incluyendo las MSC de diferentes orígenes tisulares) (Hsiao, et al., 2012) que se une a receptores hepta-helicoidales acoplados a proteínas G hetero-triméricas (principalmente CCR2A y CCR2B) (Deshmane, et al., 2009), induciendo la producción de otros factores tróficos vinculados con la regulación de la neovascularización, como los de la familia de factores de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF), el factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor*, PlGF), TGF $\beta$  y los factores de crecimiento fibroblásticos (*Fibroblast Growth Factor*, FGF) (Heil, et al., 2006).

Como angiogénesis se conoce el desarrollo de un lecho capilar resultado de la proliferación, migración y reorganización de células endoteliales en respuesta a la hipoxia tisular. La hipoxia estabilizando HIF1 $\alpha$ , favorece la estructuración de la forma activa de HIF (hetero-dimero compuesto por las isoformas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ )) que se une a secuencias activadoras en el promotor de genes codificantes de factores como los de la familia VEGF y sus receptores, angiopoyetinas, FGF, la forma inducible de la sintasa de óxido nítrico (*Inducible Nitrous Oxide Synthase*, iNOs), y factores de crecimiento similares a la insulina (*Insuline like Growth Factor*, IGFs) (Pugh, et al., 2003).



Aunque se ha demostrado la participación de todos estos factores en el desarrollo de la angiogénesis, se considera que VEGF-A es el factor pro-angiogénico más potente, gracias a la capacidad que tiene de inducir la proliferación, migración y reorganización de las células endoteliales (Ferrara, et al., 2003).

Se conocen al menos cinco isoformas de VEGF-A, miembro fundante de la familia VEGF. Generadas por splicing alternativo, estas isoformas se diferencian en su longitud (204, 189, 165, 145 y 121 residuos de aminoácidos) lo cual además las diferencia en su actividad biológica, definida por su capacidad de unión al heparán sulfato de la matriz extracelular y su unión a receptores específicos (VEGFR1 y 2) tipo kinasa de tirosina (la isoforma de 165 residuos es la de mayor actividad biológica) (Ferrara, 2004).

Los cambios locales de estos y otros factores de efecto trófico, inducen proliferación, migración y diferenciación de variadas especies celulares (incluyendo células endoteliales), además de la liberación de moléculas como la Metalopeptidasa 9 de la matriz (*Matrix Metalloproteinase 9*, MMP-9) y el activador del plasminógeno, involucradas en la degradación de la membrana basal que rodea el vaso sanguíneo, dando origen al nuevo brote vascular.

TABLA 1.2. FACTORES CON CAPACIDAD PRO-NEOVASCULARIZANTE

Nombre del ligando (nombre antiguo)	Receptor/su strato	Función
<b>VEGF</b>	VEGFR	Proliferación, migración y supervivencia de células endoteliales, además de la permeabilización vascular y vasodilatación, y la producción de proteasas que modifican la matriz extracelular (Bobek, et al., 2006).
<b>HGF</b>	c-MET	Promueve proliferación de células endoteliales, supervivencia, migración, producción de proteasas, invasión y formación de túbulos, desarrollo de vasos colaterales, potencia la actividad del VEGF, antiapoptótico de cardiomiocitos (Zeng, et al., 2015) y sinergismo con VEGF (Van Belle, et al., 1998)
<b>bFGF</b>	FGFR 1-4	Induce la proliferación, migración de las células endoteliales y producción de proteasas que modifican la matriz extracelular (Cross, et al., 2001)
<b>EGF</b>	EGFR	Induce la proliferación y migración de las células endoteliales además de la diferenciación de los precursores angioblásticos (Liekens, et al., 2001)
<b>PDGF-BB</b>	PDGFR	Induce la proliferación y migración de células endoteliales además de la diferenciación de precursores angioblásticos (Liekens, et al., 2001), y la quimiotaxis de células endoteliales y pericitos que estabilizan el vaso sanguíneo en formación (Carmeliet, 2003)
<b>IGF-1</b>	IGFR	Induce la proliferación y migración de células endoteliales e inhibe su apoptosis, induce la diferenciación de precursores angioblásticos y favorece la estabilización de los vasos sanguíneos en formación (Liekens, et al., 2001)
<b>GM-CSF</b>	GMCSFR	Induce la proliferación y migración de células endoteliales, además de la producción de VEGF (Liekens, et al., 2001)
<b>G-CSF</b>	GCSFR	Induce la proliferación y migración de células endoteliales (Liekens, et al., 2001)
<b>PIGF</b>	VEGFR1	Diferenciación y migración de células endoteliales (d'Audigier, et al., 2014)
<b>TGF-β</b>	TFG-βR	En ciertas circunstancias puede estimular la proliferación de células endoteliales, diferenciación de precursores angioblásticos y maduración de los vasos sanguíneos en formación (Tian, et al., 2011)
<b>Angiopoyetinas</b>	Tie2	Promueven la estabilización de las interacciones célula-célula en la remodelación vascular (Welti, et al., 2013)
<b>E-Selectin, VE-cadherin, PECAM (CD31), VCAM-1</b>		Moléculas de adhesión involucradas en la migración de las células endoteliales, interacción célula-célula y estabilización de los brotes angiogénicos (Polverini, 2002)
<b>MMPs</b>	Colágeno fibrilar y no fibrilar	Modificación de la matriz extracelular (Liekens, et al., 2001)
<b>TNF-α</b>		Aumenta la expresión de moléculas de adhesión (Keeley, et al., 2011)
<b>HIF alfa</b>	HIF beta	Induce la expresión de diferentes genes involucrados con la inducción de la neovascularización, incluyendo a VEGF (Pugh, et al., 2003)
<b>Angiogenina</b>	AngiogeninR	Induce la migración de células endoteliales y la diferenciación de precursores angioblásticos (Liekens, et al., 2001)

Continuación Tabla 1.2

<b>IL-1</b>	CD121	Modula de la respuesta inflamatoria y aumenta la expresión de moléculas de adhesión (Keeley, et al., 2011)
<b>IL-2</b>	CD122	Modulación de la respuesta inflamatoria y estabilización del vaso sanguíneo en formación (Bouchentouf, et al., 2011)
<b>IL-6</b>	CD126	Induce la proliferación y migración de células endoteliales, además de la síntesis de factores como HGF y VEGF (Middleton, et al., 2014)
<b>iNOS</b>		Induce la vasodilatación y la producción de CCL2 (Troidl, et al., 2010)
<b>CCL-1 (I-309)</b>	CCR8	Induce la migración de células endoteliales y diferenciación de progenitores angioblásticos (Bernardini, et al., 2000)
<b>CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8), CXCL1-3 (GRO)</b>	CXCR2	Inducen la migración y proliferación de células endoteliales (Belperio, et al., 2000), además de modular la respuesta inflamatoria asociada (Wolti, et al., 2013)
<b>CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4)</b>	CCR2, CCR3 y CCR5	Inducen la producción de metaloproteinasas que modifican la matriz extracelular y apoyan la modulación de la respuesta inflamatoria (Keeley, et al., 2008, Keeley, et al., 2011)

TABLA 1.3. FACTORES CON CAPACIDAD ANTI-NEOVASCULARIZANTE

Nombre del ligando (nombre antiguo)	Receptor/sustrato	Función
<b>Angiostatina</b>	AngioR	Reprime la proliferación y migración de células endoteliales y estimula su apoptosis (Liekens, et al., 2001), e inhibe el crecimiento y permeabilización de vasos sanguíneos (Simons, 2005)
<b>Endostatina</b>	EndosR	Reprime la proliferación de células endoteliales y estimula su apoptosis (Liekens, et al., 2001)
<b>CXL11 (I-TAC)</b>	CXCR3B	Represión de la proliferación y migración de células endoteliales (Belperio, et al., 2000)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	IFN- $\gamma$ R	Induce la producción de citoquinas ELR` (como CXCL11) (Belperio, et al., 2000)
<b>TIMPs</b>	Metaloproteinasas	Reprimen la modificación de la matriz extracelular (Liekens, et al., 2001)
<b>IL-4</b>	CD124	Represión de los efectos de VEGF y bFGF (Lee, et al., 2002)
<b>IL-10</b>	CDw210	Represión de los efectos de VEGF y modulación de la respuesta inflamatoria (Silvestre, et al., 2000)

Posteriormente y gracias a la liberación de otros factores como el de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*, PDGF), TGF $\beta$  y PlGF, otras células de soporte como pericitos y células de músculo liso, son atraídas para dar forma final al nuevo vaso.

Las citoquinas son glico-proteínas pequeñas, producidas por un amplio número de células, predominantemente leucocitos, y están involucradas en la regulación de procesos como la respuesta inmune, la inflamación, la hematopoyesis y la angiogénesis. Igualmente, se ha sugerido que el perfil de expresión de los genes codificantes de citoquinas y quimioquinas, está relacionado con el fenotipo de las MSC (Reikvam, et al., 2015) y que la activación por citoquinas (Dranoff, 2004) y quimioquinas (Mantovani, et al., 2010) está involucrada en la modulación de proliferación y diferenciación de células madre.

Las quimioquinas, además de potentes factores quimiotácticos de linfocitos participan en la modulación de la neovascularización. Las quimioquinas forman una superfamilia compuesta por unas 50 proteínas homólogas a citoquinas de unión a heparina, con pesos que varían entre 8 y 10 KDa, reconocidas por su capacidad de reclutamiento de leucocitos. Se caracterizan por presentar una secuencia de residuos de cisteína (Cys, C) en su extremo N-terminal y la organización de estos motivos de cisteína ha permitido subclasificarlas en cuatro subfamilias: CC, CXC, C y CX<sub>3</sub>C, siendo las dos primeras las más grandes. Las primeras dos cisteínas del N-terminal son contiguas en la subfamilia CC, mientras que en las de la familia CXC, están separadas por un aminoácido diferente (Cys-X-Cys). Las quimioquinas CXC pueden a su vez ser subclasificadas en función de la presencia o ausencia de un dominio Glutamato (E)-Leucina (L)-arginina (R) (Spaggiari, et al.) (Keeley, et al., 2008). Se ha demostrado que la secuencia ELR es esencial para la interacción de las quimioquinas CXC ELR+ con sus receptores (CXCR1 y CXCR2). Las quimioquinas CXC ELR+ (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 y CXCL8) se caracterizan por ser potentes

quimio-atrayentes, activadoras de neutrófilos y poseer gran capacidad pro-neovascularizante, lo cual se ha sugerido que se deba, al menos en parte, a la inducción de migración y proliferación de células endoteliales que expresan los receptores de CXCR2 y CXCR1 (Keeley, et al., 2008). De otra parte, las quimioquinas CXC ELR- (CXCL4, CXCL9-CXCL17) se caracterizan por su capacidad angiostática, además de su capacidad de activación de linfocitos y monocitos. La IL-1 y el FNT- $\alpha$  son potentes estimuladores de la síntesis de quimioquinas CXC ELR+, mientras que el IFN- $\gamma$  estimula la producción de quimioquinas CXC ELR-.

La subfamilia CC de quimioquinas es la más grande y de ella hacen parte CCL1 (I-309), CCL2 (MCP1), CCL8 (MCP2), CCL7 (MCP3) y CCL13 (MCP4). CCL1 es una glicoproteína secretada por células T activadas e interactúa con el receptor CCR8 que induce proliferación, migración y activa sistemas anti-apoptóticos en monocitos, células NK, células B inmaduras y células dendríticas, además de células endoteliales y células de músculo liso vascular. Se ha demostrado que las células endoteliales expresan CCR2 (receptor estimulado por CCL2) y su activación se ha correlacionado con la inducción de su migración y formación de tubos in vitro (Galvez, et al., 2005), lo cual se ha confirmado además en modelos vivos (Barcelos, et al., 2004) en un mecanismo dependiente, al menos en parte, de la activación de metaloproteinasas (Galvez, et al., 2005) y el sistema de VEGF-A (Hong, et al., 2005), no así de la quimiotaxis de leucocitos (Salcedo, et al., 2000).

El sistema de quimioquinas es bastante complejo y esta complejidad aparece en al menos dos aspectos diferentes. Primero, existe amplia promiscuidad entre ligandos y receptores, lo cual implica que todos los ligandos se unen a más de un receptor y todos los receptores se unen con más de un ligando.

Segundo se conocen 23 receptores que se organizan como proteínas de membrana heptahelicoidales, 19 de los cuales ya se ha demostrado están acoplados a sistemas de proteínas G hetero-triméricas. El sistema de transducción de la señal es otro de los niveles donde se le agrega complejidad a este sistema. Se ha demostrado que aunque varias quimioquinas se pueden unir al mismo receptor, el efecto de esta interacción es diferente en cada caso. Por ejemplo, se ha demostrado que además de CXCL2, CXCL8 se une a CXCR1 y 2. Sin embargo, la unión de CXCL8 ocasiona fosforilación, desensibilización e internalización del receptor (Sozzani, et al., 2015).

#### 1.4. PRODUCCIÓN DE LAS MSC

La terapia celular avanzada es cada vez más usada como alternativa terapéutica en espacios asistenciales, circunstancia demostrada con los más de 1000 millones de dólares que mueve anualmente en EEUU (Mason, et al., 2012) y el creciente número de ensayos clínicos que vienen siendo desarrollados para su implementación clínica (Ratcliffe, et al., 2013), especialmente aquellos en los que se evalúan las MSC (Squillaro, et al., 2015).

No obstante, los protocolos actuales de producción celular podrían ser mejorados para obtener un producto más seguro, haciendo viable la mejoría de los resultados obtenidos.

Este podría ser uno de los factores que explica por qué solo 3 de los 493 ensayos clínicos con MSC se encuentran en fase IV (Squillaro, et al., 2015).

La producción (extracción, cultivo *in vitro* y criopreservación) de MSCs, tiene como objetivo la obtención de un número suficiente de células (usualmente millones de ellas) para su aplicación terapéutica, preservando sus características fenotípicas. La producción de MSC para aplicaciones terapéuticas implica su manipulación sustancial en actividades requeridas para su extracción de la fuente primaria, cultivo *in vitro* hasta alcanzar el número requerido de células para su trasplante y hacerlo, o crio-preservarlas hasta el momento de su trasplante.

En todas estas actividades se usan moléculas de origen bacteriano o animal (xenogénico), lo cual implica un claro riesgo para los potenciales receptores de estas células. Desarrollar protocolos libres de moléculas xenogénicas (xeno-free) para la producción de MSC, es un paso importante en la viabilización de la implementación de su aplicación o la de sus derivados (Hanley, et al., 2013, Warnke, et al., 2013).

Aunque el cultivo y la criopreservación de las ASC y BMSC son iguales, los protocolos de extracción presentan algunas diferencias derivadas de la naturaleza de su tejido de origen. Se ha sugerido que las ASC hacen parte de la población celular nucleada que habita el estroma perivascular de diferentes tejidos (Crisan, et al., 2008), incluyendo el tejido adiposo (Murray, et al., 2013, Quirici, et al., 2010, Traktuev, et al., 2008), lo cual explica la necesidad del uso de enzimas como la colagenasa (de origen bacteriano), para degradar la

matriz extracelular y liberar las células que en ella se encuentran. Ya han sido reportados protocolos para la extracción de ASC sin el uso de enzimas, implementando la técnica del explante de tejido adiposo (Beltran, 2007, Jing, et al., 2011, Linero, et al., 2014b) o disgregando mecánicamente el tejido (Baptista, et al., 2009, Bianchi, et al., 2013).

El cultivo in vitro de las MSC requiere el uso de medios estándar de cultivo celular (como *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM; o *Roswell Park Memorial Institute*, RPMI), suplementados, usualmente, con suero de diferentes especies animales, que usualmente es de fetos bovinos (*Fetal Bovine Serum*, FBS)

El medio de cultivo es probablemente el elemento más importante del ambiente artificial diseñado para garantizar el adecuado crecimiento y funcionamiento celular en el cultivo *in vitro*. Debe asegurar el adecuado aporte de nutrientes para el metabolismo, garantizando el crecimiento y proliferación celular, por lo cual debe contener precursores para las funciones celulares anabólicas y catabólicas, como sustratos energéticos, vitaminas, y demás elementos que estabilizan características como el pH o la osmolaridad (Brunner, et al., 2010).

El FBS es en realidad un complejo coctel de moléculas que estimulan la adherencia y proliferación celular, por lo cual es usado para el cultivo in vitro de un amplio y diverso grupo de células humanas y animales. El FBS es una mezcla extremadamente compleja de biomoléculas incluyendo proteínas, ácidos grasos y lípidos, carbohidratos, aminoácidos y minerales. Estas moléculas tienen funciones muy variadas, incluyendo inducción de



crecimiento y proliferación celular (factores de crecimiento y hormonas), transporte de biomoléculas como hormonas o lípidos (proteínas transportadoras), unión a matriz extracelular e intercelular (proteínas de unión y factores de adherencia celular), (Brunner, et al., 2010)

Todas estas moléculas son usadas por las células, lo cual implica que algunas sean absorbidas o que por lo menos entren en contacto con las ellas. De hecho, ya se ha calculado que una preparación de  $10^8$  MSCs contiene entre 7 y 30 mg de proteínas bovinas (Spees, et al., 2004). Teniendo esto en cuenta, no es sorprendente que las MSC cultivadas en FBS sean susceptibles de rechazo inmunológico al ser trasplantadas (Martin, et al., 2005, Sundin, et al., 2007) o que actúen como vector para la transmisión de zoonosis (Brown, et al., 2001).

Ya se ha demostrado que las células madre cultivadas en medios suplementados con FBS expresan una forma inmunogénica no humana de ácido siálico (Neu5Gc) (Martin, et al., 2005), y la exposición de las células a los anticuerpos humanos contra Neu5Gc ocasionó su muerte (Fekete, et al., 2012a).

Esta evidencia también ha tenido confirmación clínica. Se ha reportado la respuesta inmune contra antígenos del FBS en individuos que recibieron células cultivadas con este suplemento nutricional (Sundin, et al., 2007), además de la aparición de urticaria difusa y la producción de anticuerpos contra proteínas del FBS después de la aplicación repetida de MSC producidas con FBS (Horwitz, et al., 2002, Selvaggi, et al., 1997).

Ya han sido reportados y ensayado diferentes sustitutos del FBS para la producción de MSC xeno-free, algunas alternativas que ya están disponibles comercialmente (Miwa, et al., 2012, Riis, et al., 2016), además del lisado plaquetario humano (*Human Platelet lysate*, hPL).

Las plaquetas son pequeñas estructuras enucleadas de origen hematopoyético que participan en diferentes procesos vitales, incluyendo el cierre de heridas y regeneración tisular general, liberando un amplio grupo de factores de crecimiento y citoquinas. Son producidas mediante la fragmentación de megacariocitos en la médula ósea y liberadas al torrente sanguíneo donde circulan por un lapso cercano a los 8 días (Harrison, 2005). Estas, las segundas estructuras más abundantes en la sangre, cuentan con organelas como mitocondrias, además de tres tipos diferentes de gránulos intracelulares donde se almacenan diferentes factores solubles, incluyendo proteínas de efecto trófico, que les permiten a las plaquetas asumir su rol fisiológico (Zufferey, et al., 2012).

Los gránulos alfa (200 – 500 nm) son los más abundantes (80 por plaqueta) y más heterogéneos en contenido. Cuentan con una amplia variedad de proteínas en su interior (incluyendo factores de efecto trófico como PDGF), todas ellas involucradas con el reclutamiento y activación plaquetario, además de la adhesión celular, coagulación, cicatrización y reparación de heridas (Zufferey, et al., 2012). Las plaquetas cuentan además con gránulos densos, más pequeños y escasos (llenos con moléculas de bajo peso molecular como nucleótidos, neurotransmisores y iones) y lisosomas, de tamaño

intermedio entre los gránulos alfa y los densos, que además son los más escasos de los tres.

Las plaquetas y sus derivados han sido usados por muchos años como alternativa terapéutica para la regeneración de tejidos como los osteo-articulares (Dohan Ehrenfest, et al., 2014), y hace relativamente poco fueron propuestas como fuente de alternativas para la sustitución del FBS.

La producción del lisado plaquetario se fundamenta en la lisis de las plaquetas y sus gránulos mediante congelación y descongelación, con lo cual se busca obtener una solución de las moléculas almacenadas en los gránulos plaquetarios.

El hPL no tiene las debilidades ya descritas del FBS, es muy económico (Fekete, et al., 2012b, Kinzebach, et al., 2013) y garantiza la viabilidad de las MSC, mejora su tasa de proliferación (comparándola con la proliferación de MSC cultivadas en medios suplementados con FBS) (Doucet, et al., 2005, Jonsdottir-Buch, et al., 2013, Schallmoser, et al., 2007), retrasa la senescencia celular característica de los cultivos con FBS (Griffiths, et al., 2013), y garantiza la estabilidad genómica celular (Trojahn Kolle, et al., 2013).

Ha sido ensayado como suplemento para el cultivo in vitro de las MSC, a diferentes concentraciones (2, 5 y 10%), y se ha reportado que al 5% garantiza una mejor tasa de replicación y retrasa la senescencia celular, además de garantizar la estabilidad fenotípica de las células (Griffiths, et al., 2013). No obstante, su uso para la producción de MSC se ha

visto frenado, al menos en parte, por la formación de coágulos de fibrina en el cultivo, lo cual dificulta su uso para otras fases de la producción de las MSC como la criopreservación.

Esta dificultad se ha tratado de superar con la adición de heparina, sin embargo se ha demostrado que este glucosaminoglicano tiene efectos deletéreos sobre las MSC, cuando es usado a las concentraciones habituales de anticoagulación, los cuales se evidencian en la reducción de la proliferación (Hemeda, et al., 2013) aumento del tamaño y desarrollo de senescencia de las MSC (Ling, et al., 2015).

La heparina es un herapan glucosaminoglicano sulfatado, que activa la anti-trombina III, glicoproteína que inhibe diferentes factores de la coagulación incluyendo la trombina. La intensa carga negativa de la heparina (otorgada por la gran cantidad de grupos sulfatos que presenta), le brinda afinidad por dominios de unión a heparina (*heparin binding domains*, HBDs), los cuales tienen carga positiva y se encuentran en un amplio grupo de proteínas extracelulares incluyendo factores de crecimiento como los FGFs, VEGFs o BMP.

Hemeda y colaboradores (Hemeda, et al., 2013) demostraron que la heparina usada a las concentraciones habituales para cultivo celular ( $\approx 2$  UI/mL) reprime de manera significativa la proliferación de las MSC (evaluaron hBMSC y hASC), aunque sus datos sugieren que el efecto anticoagulante es alcanzado con 0,61 UI/mL. No obstante Ling L y colaboradores (Ling, et al., 2015), encontraron que a concentraciones muy inferiores (0,016 UI/mL) induce la proliferación de MSCs cultivadas en medios suplementados con FBS, pero

encontraron un efecto contrario al usar concentraciones superiores a 10 UI/mL. De otra parte, Ling L y colaboradores demostraron que el cultivo de las MSC por largos períodos de tiempo en presencia de heparina, modifica el patrón transcripcional de un amplio grupo de genes, incluyendo aquellos relacionados con la diferenciación celular, lo cual podría modificar de manera importante el fenotipo de las células.

No se conoce la totalidad de las moléculas que componen el hPL, teniendo en cuenta además que se han propuesto diferentes protocolos para su producción (Dohan Ehrenfest, et al., 2014) y se ha podido documentar variabilidad en la composición del producto obtenido (Weibrich, et al., 2003). Sin embargo se han documentado concentraciones significativas de factores tróficos como TGF- $\beta$ , IGF-1, EGF, VEGF y bFGF, además de las diferentes isoformas de PDGF (Crespo-Diaz, et al., 2011, Fekete, et al., 2012a).

PDGF-BB es un factor de crecimiento de notable capacidad mitogénica sobre diferentes tipos celulares derivados del mesodermo como fibroblastos, pericitos, células de músculo liso, células gliales y mesangiales (Heldin, et al., 1999). La forma activa de PDGF es un dímero de las cuatro isoformas conocidas hasta ahora (A-D), organizándose como un homo o hetero-dímero de ellas (AA, BB, AB, CC, DD). Estas cinco variantes funcionales pueden unirse a dos tipos diferentes de receptor de clase III (PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ ), los cuales activan diferentes vías de transducción de señales intracelulares después de autofosforilarse (Magnusson, et al., 2007). Se sabe que cada variante tiene diferentes afinidades para cada receptor, que PDGF-BB se une con mayor afinidad a PDGFR $\beta$  el cual

es expresado por las hASC (Gehmert, et al., 2011, Kim, et al., 2015), y que su activación está directamente relacionada con la proliferación, diferenciación y migración de las hASC (Fierro, et al., 2007, Kim, et al., 2015), además de su capacidad pro-neovascularizante (Lopatina, et al., 2014).

No obstante, la mezcla de EGF, PDGF-BB y bFGF a las concentraciones que se encuentran en el hPL, no logró reproducir el efecto del hPL sobre las MSC (Chieragato, et al., 2011, Fekete, et al., 2012a), lo cual sugiere que otras moléculas adicionales tienen importancia en el efecto que el efecto fenotípico del hPL sobre las MSC.

Por lo anterior, nosotros nos hemos planteado la siguiente hipótesis:

La capacidad neovascularizante del secretoma de las hASC, no es modificada por la producción celular bajo condiciones xeno-free o el pase celular.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

La implementación clínica de las MSC como alternativa terapéutica para la medicina regenerativa se vería favorecida por su producción bajo condiciones *xeno-free*, lo cual reduciría el riesgo de eventos adversos relacionados con el rechazo inmunológico (Martin, et al., 2005, Sundin, et al., 2007), la transmisión de zoonosis ((CHMP), 2013, Tekkatte, et al., 2011) o ambas.

Solo se ha implementado la producción *xeno-free* de BMSC (Hanley, et al., 2013, Warnke, et al., 2013) a pesar de que las ASC tienen varias ventajas frente a las BMSC como alternativa terapéutica para la medicina regenerativa. Son más estables fenotípica y genómicamente, tienen mayor potencial de proliferación (Izadpanah, et al., 2006) y menor tendencia al desarrollo de senescencia (Kern, et al., 2006), conservan su multipotencialidad por mayor tiempo (en cultivo *in vitro*), e incluso favorecen la hematopoyesis con mayor eficiencia que las BMSC (De Toni, et al., 2011).

Es importante desarrollar y estandarizar un protocolo para la producción *xeno-free* de hASC para su futura producción grado clínico. Para esto, se requiere evaluar el impacto que la producción *xeno-free* pueda tener sobre el fenotipo celular y los cambios que pudiera desarrollar como consecuencia de su expansión *in vitro*.

Teniendo en cuenta que el potencial de las MSC como inductoras de regeneración tisular, depende, al menos en parte, de su secretoma neovascularizante; una forma correcta de evaluarlas funcionalmente es caracterizar las diferencias del secretoma neovascularizante de las células cultivadas bajo condiciones xeno-free frente a las células cultivadas bajo condiciones estándar (en medios de cultivo suplementados con FBS).

Se ha demostrado la estabilidad cromosómica de las MSC al ser cultivadas en medios suplementados con hPL (Trojahn Kolle, et al., 2013) además de garantizar su viabilidad y proliferación conservando sus características fenotípicas (Doucet, et al., 2005, Schallmoser, et al., 2007), sin embargo no se ha descrito el efecto que su producción bajo estas condiciones tendría sobre su secretoma, lo cual además de brindar información adicional acerca de su funcionamiento general, otorgaría elementos importantes para su prospección como alternativa terapéutica de medicina regenerativa para trastornos degenerativos.

El amplio repertorio de moléculas de efecto trófico liberado por las MSC incluye moléculas involucradas en la regulación de diferentes procesos implicados en la correcta regeneración tisular, como la proliferación y apoptosis, migración y diferenciación celular apoptosis, además de neovascularización, respuesta inflamatoria y fibrosis, (Gnecchi, et al., 2008, Kupcova Skalnikova, 2013, Lavoie, et al., 2013, Liang, et al., 2014, Maxson, et al., 2012).



Se ha sugerido que la neovascularización es un elemento central de la regeneración de un amplio grupo de tejidos incluyendo hueso, piel, sistema nervioso y sistema cardiovascular (Caplan, et al., 2006). Caracterizar cualitativa, cuantitativa y funcionalmente el secretoma neovascularizante (también conocido como secretoma angiogénico) de las hASC producidas en condiciones *xeno-free*, brindará una idea de la capacidad de inducción de regeneración tisular que estas células podrían llegar a tener en aplicaciones clínicas, además otorgar luces respecto al efecto que estas condiciones de producción puedan tener sobre el funcionamiento general de las MSC.

El grupo de Biología de Células Madre de la Universidad Nacional sede Bogotá ha venido trabajando en cooperación con el Hemocentro de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, en el desarrollo de un programa de terapia celular avanzada, el cual tiene en la viabilización de la terapia celular para la medicina regenerativa, su principal foco.

Los resultados del presente estudio permitirán estandarizar la producción de hASC *xeno-free* grado clínico y comprender mejor el efecto que el hPL tiene sobre el funcionamiento de las MSC en cultivo *in vitro*, además de brindar información pertinente para el diseño y ejecución de futuros ensayos en modelos animales y/o ensayos clínicos, que viabilicen la aplicación terapéutica de estas células en seres humanos.

## 2.2. OBJETIVOS

### 2.2.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener, cultivar y criopreservar en condiciones xeno-free, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC) y evaluar cualitativa, cuantitativa y funcionalmente su secretoma neovascularizante

### 2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el protocolo Xeno free de extracción, cultivo y criopreservación de hASC.
- Describir las similitudes y diferencias cualitativas y cuantitativas del secretoma neovascularizante de las hASC de pase 4 y 7, producidas en condiciones xeno-free y condiciones estándar.
- Caracterizar la funcionalmente el secretoma neovascularizante de las hASC de pase 4 y 7 producidas en condiciones xeno-free y condiciones estándar, mediante modelos *in vitro* y *ex vivo*.
- Caracterizar funcionalmente el secretoma neovascularizante de las hASC producidas en condiciones xeno-free y condiciones estándar, mediante un modelo *in vivo* de isquemia tisular periférica.

---

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. PRODUCCIÓN XENO-FREE DE HASC

#### 3.1.1. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL LISADO PLAQUETARIO HUMANO (HPL)

Para la producción xeno-free de las hASC es indispensable contar con hPL. Para la producción del hPL se utilizó el contenido de 10 unidades de plaquetas, obtenidas de donantes adultos de ambos sexos y de diferentes grupos sanguíneos, donadas por el Hemocentro de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, las cuales fueron mezcladas en dos grupos (lotes) independientes, y centrifugadas a 1200 x g durante 15 minutos recuperando posteriormente el precipitado.

Después de re-suspender el precipitado con PBS hasta completar el mismo volumen previamente depositado en cada recipiente, las plaquetas fueron congeladas en alícuotas de 50 ml a -20°C durante 24 horas para ser posteriormente descongeladas a 4°C, homogenizadas y centrifugadas a 1200 x g durante 15 minutos y recuperar así el sobrenadante, el cual fue filtrado a través de poros de 0,22 µm y en alícuotas de 10 ml almacenado a -20°C.

##### 3.1.1.1. Cuantificación de proteínas del hPL

Se utilizó el paquete comercial Pierce BCA (Pierce, Rockford, IL, USA). Según sus instrucciones, se hicieron diluciones 1:5 y 1:10 del hPL en volúmenes de 25 µl y se incubó

cada una con 200 µl de la solución de reacción a 37°C durante 30 minutos. La absorbancia fue medida a 660 nm en un lector de platos (BIO-RAD, Ultramark).

### **3.1.2. EXTRACCIÓN DE LAS HASC**

Previo a la firma y aprobación de consentimiento informado (anexo 1), se extrajeron hASC a partir de dos muestras (muestra A y muestra B) obtenidas mediante lipectomía electiva, modificando un protocolo previamente descrito (Jing, et al., 2011).

Aproximadamente 10 gramos de tejido adiposo, fueron lavados tres veces con PBS + penicilina (200 Ui)/anfotericina (200 ug/ml)/estreptomicina (500 ng/ml). Fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> fueron sembrados en pozos de 40 mm (Greiner Bio-One) e incubados en una atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante dos horas, para posteriormente agregar 1 ml de OptiMEM, suplementado con 5% de hPL o 10% de FBS y penicilina (100 Ui)/anfotericina (100 ug/ml)/estreptomicina (250 ng/ml) (Medio completo-hPL, CoM-hPL o Medio completo-FBS, CoM-FBS) e incubar durante 24 horas en una atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se agregaron 500 µl de CoM-hPL o CoM-FBS, para continuar incubando en una atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco, dos veces por semana hasta que las células alcanzaran 70 – 80% de confluencia, momento en el cual fueron retirados los explantes, se lavó la monocapa celular dos veces con PBS + penicilina (200 Ui)/anfotericina (200 ug/ml)/estreptomicina (500 ng/ml) y se continuaron los cultivos en CoM-hPL o CoM-FBS.

**3.1.2.1. Evaluación de la proliferación celular de las hASC**

Siguiendo las instrucciones del fabricante se utilizó el paquete comercial CyQuant NF Cell Proliferation Assay Kit (Life Technologies, Grand Island, NY). 2000 células de cuarto pase fueron sembradas por triplicado en pozos de 6,4 mm<sup>2</sup> y cultivadas en CoM-hPL o CoM-FBS bajo una atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 12 horas, 1, 2, 7 y 14 días de cultivo, se cuantificaron las células midiendo la absorbancia a 530 nm en un lector de platos (BIO-RAD, Ultramark), después de incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la solución de tinción. Los resultados fueron comparados con una curva de concentraciones celulares conocidas, cultivadas en CoM-hPL o CoM-FBS.

El doblaje poblacional se calculó usando la fórmula (Bieback, et al., 2009):

$$X = \frac{[\log_{10}(N_H) - \log_{10}(N_1)]}{\log_{10} 2}$$

Donde N<sub>H</sub> corresponde al número de células en cada lectura y N<sub>1</sub> corresponde al número de células sembradas inicialmente.

**3.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS HASC**

**3.1.3.1. Inmunofenotipificación**

5 x 10<sup>5</sup> hASC de cuarto pase fueron recuperadas con TrypLE™ Select (Life Technologies, Grand Island, NY) e incubadas con anticuerpos anti-CD34 humano monoclonal conjugado a APC (clone AC 136/ isotype IgG2A/ Miltenyi Biotec), anti-CD45 humano monoclonal

conjugado a RPE-Cy5 (clone T29/33/ Isotype IgG<sub>1</sub>/ Dako Cytomation), anti-CD73 humano monoclonal conjugado a PE (clone D2/ Isotype IgG<sub>1</sub>/ BD Pharmingen), anti-CD90 humano monoclonal conjugado a APC (clone F15-42-1/ Isotype IgG<sub>1</sub>/ AbD Serotec), anti-CD105 humano monoclonal conjugado a PE (clone SN6/ Isotype IgG<sub>1</sub>, EBioscience), anti- HLA-ABC humano monoclonal conjugado a FITC (clone w6/32/ istotype IgG2A/ AbD Serotec), anti- HLA-DR humano monoclonal conjugado a RPE (clone AB3/ isotype IgG2A/Dako Cytomation), y sus respectivos controles de isotipo IgG2a/APC, IgG1/RPE-Cy5, IgG1/PE, IgG1/APC, IgG2A/FITC IgG2A/RPE (Dako Cytomation). Tabla 3.1

**Tabla 3.1. Anticuerpos utilizados para la inmunofenotipificación de las hASC, siguiendo los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Citoterapia.**

Antígeno	Clon	Fluorocromo	Marca
<b>CD34</b>	AC 136	APC	Miltenyi Biotec
<b>CD45</b>	T29/33	RPE-Cy5	Dako Cytomation
<b>CD73</b>	AD2	PE	BD Pharmigen
<b>CD90</b>	F 15-42-1	APC	AbD, Serotec
<b>CD105</b>	Sn6	APC	eBioscience
<b>HLA-ABC</b>	W6/332	FITC	AbD, Serotec
<b>HLA-DR</b>	AB/3	RPE	Dako Cytomation
<b>Controles de Isotipo</b>		APC, FITC, RPE	Dako Cytomation

Las lecturas fueron hechas en un citómetro FACSCanto ubicado en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Hemocentro Distrital de Bogotá, D.C. Al menos 10,000 eventos fueron adquiridos de una región correspondiente a una población de alta complejidad celular (side scatter) y tamaño (foward scatter), analizando la expresión de cada antígeno por separado.

La expresión de cada antígeno se analizó mediante el software FCS express (De Novo Software, Los Angeles, CA).

### **3.1.3.2. Evaluación del potencial de Diferenciación de las hASC**

#### ***Linaje adipogénico***

hASC de cuarto pase fueron recolectadas con TrypLE™ Select (Life Technologies, Grand Island, NY), y sembradas por triplicado en pozos de 22 mm de diámetro a una densidad de 5000/cm<sup>2</sup>. Para inducir la diferenciación adipogénica fueron cultivadas en condiciones de normoxia en el medio inductor de diferenciación adipogénica StemPro® Adipogenesis differentiation kit (Life Technologies, Gibco) durante dos semanas (renovando el medio de cultivo dos veces por semana), siguiendo las instrucciones del fabricante. Transcurrido este tiempo, se lavó dos veces la monocapa celular con PBS, y se fijaron las células con formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente, para teñirlas con aceite rojo O al 0,5% durante 30 minutos. El exceso de tinción fue removido con agua destilada para documentar la tinción mediante visualización bajo microscopio de contraste de fases.

#### ***Linaje osteogénico***

Células de cuarto pase celular fueron recuperadas con TrypLE™ Select (Life Technologies, Grand Island, NY), y sembradas por triplicado en pozos de 22 mm de diámetro a una densidad de 5000/cm<sup>2</sup>. Para inducir la diferenciación osteogénica fueron cultivadas en condiciones de normoxia en el medio inductor de diferenciación osteogénica StemPro®

Osteogenesis differentiation kit (Life Technologies, Gibco) durante dos semanas (renovando el medio de cultivo dos veces por semana), siguiendo las instrucciones del fabricante. Transcurrido el tiempo de cultivo, la monocapa celular fue lavada dos veces con PBS y se fijaron las células con formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas tres veces con agua, y teñidas durante 45 minutos en oscuridad con alizarina roja, para posteriormente remover el exceso de tinción con PBS, y documentar el resultado mediante visualización bajo microscopio de contraste de fases.

#### **3.1.4. CRIOPRESERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN**

Células de cuarto recuperadas con TrypLE™ Select (Life Technologies, Grand Island, NY) fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. Después de descartar el sobrenadante se almacenaron las células a -80°C a una concentración de  $10^6$  células/ml, en una solución a base de hPL. Se evaluó la eficiencia del DMSO (10, 20 o 30%) (Sigma-Aldrich) y glycerol (10, 20 o 30%) como suplementos criopreservantes. Como solución de criopreservación control, se usó FBS (90%) + DMSO (10%).

Las células se retiraron del congelador para descongelarlas rápidamente con CoM-hPL o CoM-FBS previamente estabilizado a 37°C. La solución descongelada fue centrifugada a 1200 rpm durante 5 minutos para sembrar las células en CoM-hPL o CoM-FBS después de descartar el sobrenadante.



### **3.2. RECOLECCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO (MC)**

Implementando un protocolo previamente estandarizado por nuestro grupo (Restrepo-Jimenez, 2009), células de cuarto y séptimo pase a 70% de confluencia fueron lavadas dos veces con PBS, después de retirar el medio de cultivo para agregar un nuevo volumen de OptiMEM no suplementado, en el cual fueron incubadas durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se lavó nuevamente la monocapa celular dos veces con PBS, para agregar un nuevo volumen de OptiMEM no suplementado. A partir de este momento, las células fueron cultivadas durante 24 horas en una atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 21% de O<sub>2</sub>. Después de retirar el MC, se recuperaron las células para contarlas bajo cámara de Neubauer, después de teñirlas con azul tripano. El MC obtenido, fue centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm y filtrado a través de poros de 0,22 µm para posteriormente almacenarlo en alícuotas de 1,5 ml a -20 °C.

### **3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE FACTORES NEOVASCULARIZANTES EN LISADOS PLAQUETARIOS Y MEDIOS DE CULTIVO CONDICIONADOS**

Siguiendo un protocolo previamente estandarizado por nuestro grupo (Restrepo-Jimenez, 2009), se midió la concentración relativa de algunos factores de efecto paracrino asociados con la regulación de la neovascularización en los dos lotes de hPL producidos y en los MCs.

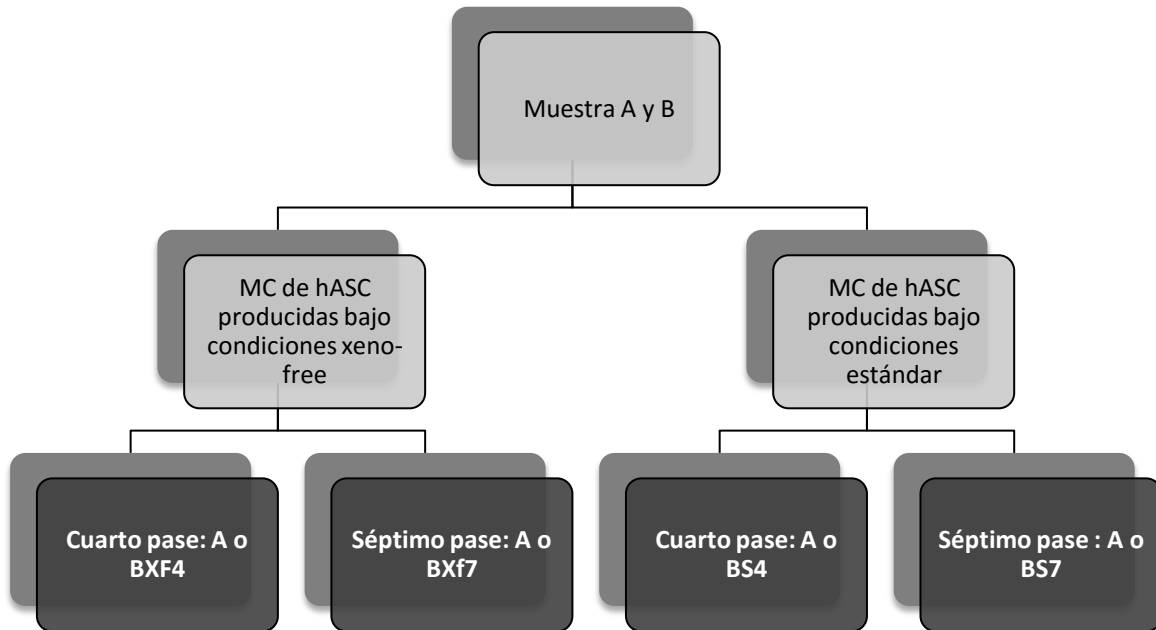
La concentración de diferentes proteínas, incluyendo el PDGF-BB, ha sido relacionada con la capacidad del hPL, como suplemento nutricional para el cultivo celular.

De otra parte, el repertorio funcional del secretoma de las MSC ha sido relacionado directamente con la capacidad regenerativa de estas células. Conocer las concentraciones relativas de las proteínas neovascularizantes en el secretoma de las MSC, sugiere la capacidad de inducción de regeneración tisular de estas células, además de brindar información respecto al funcionamiento general de ellas al ser cultivadas bajo condiciones xeno-free.

Para la caracterización cuantitativa de las proteínas del secretoma neovascularizante de las MSC, se hizo un diseño experimental en el cual se incluyeron los MCs por las dos muestras celulares, de cuarto y séptimo pase celular, cultivadas en condiciones xeno-free y estándar.

Se consideraron los siguientes grupos experimentales para cada muestra (A y B). (Fig. 2.1):

- MC por hASC de cuarto pase, producidas en condiciones estándar (con FBS): A4S, B4S.
- MC por hASC de séptimo pase, producidas en condiciones estándar: A7S, B7S.
- MC por hASC de cuarto pase, producidas en condiciones xeno-free (con hPL): A4L, B4L.
- MC por hASC de séptimo pase, producidas en condiciones xeno-free: A7L, B7L.
- Suero Fetal Bovino y OptiMEM como controles.
- Modelo in vitro de angiogénesis: Ensayo de formación de tubos en Matrigel



**FIGURA 3.1. GRUPOS EXPERIMENTALES PARA EL ARREGLO DE ANTICUERPOS**

La técnica se realizó utilizando el arreglo de anticuerpos Human Angiogenesis Array C1000 (AAH-ANG-1000, RayBiotech) que permite caracterizar la concentración relativa de 43 factores, incluyendo integrantes de las familias moleculares de VEGF, TGF $\beta$ , PDGF, los factores de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*, FGF), factores de crecimiento similares a la insulina (*Insulin like growth factor*, IGF), Interleuquinas (IL), CCL2 (MCP-1) y el factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), entre otros. Estas proteínas son identificadas mediante su unión a un arreglo de anticuerpos anclados a una membrana, formando un sistema de Elisa en sándwich, en el cual se utilizan anticuerpos primarios marcados con biotina que son identificados mediante estreptavidina conjugada con una peroxidasa de rábano (HRP). El ensayo se compone de dos membranas, las cuales

permiten identificar cada factor por duplicado, con sus respectivos controles negativos (buffer) y positivos (anticuerpos conjugados con biotina).

Las membranas se incubaron en buffer de bloqueo 1X por 30 minutos a temperatura ambiente, para agregarles las muestras (los diferentes MCs, lisados plaquetarios y controles) y se incubaron durante 12 horas a 4°C en agitación suave.

Transcurrido este tiempo, se lavaron las membranas y se incubaron en la solución de anticuerpos conjugados a biotina dos horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. Posteriormente realizaron nuevamente lavados y se incubaron durante dos horas en la solución de estreptavidina conjugada con HRP, tiempo después del cual se hicieron los lavados finales. Por último se procedió a revelar la reacción con una mezcla 1:1 del buffer de detección C y D que provee el kit, durante 2 minutos a temperatura ambiente, tiempo después del cual se descartó el exceso de la mezcla de detección y se cubrió la membrana con vinipel. Para revelar el resultado se expusieron películas de rayos x (G Kodak X-ray Film 01) a las membranas, dentro de un casete de revelado por 20-40 segundos. La intensidad de la señal obtenida para cada factor, fue cuantificada mediante el software Image J 1.4 de National Institutes of Health (NIH) de EEUU.

### **3.3.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL ARREGLO DE PROTEÍNAS**

La concentración relativa de los factores angiogénicos se calculó sustrayendo el blanco y normalizando el valor correspondiente a cada uno de los factores con respecto al control positivo interno de cada arreglo (inmunoglobulina biotinilada). Este valor a su vez, fue

normalizado con la cantidad de células que condicionaron esa cantidad de medio, expresando el resultado en Unidades Arbitrarias/millón de células.

### **3.3.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS DEL ARREGLO DE ANTICUERPOS**

La arquitectura de la red de asociación proteína-proteína del secretoma de las células en cada condición, fue reconstruida en base a toda la evidencia experimental e información genómica (cercanía, co-ocurrencia y conservación funcional) presente en las bases de datos especializadas, mediante el aplicativo on line STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (Szklarczyk, et al., 2015). Para esto, se utilizó como semilla el conjunto de identificadores de las proteínas aumentadas o disminuidas en cada condición experimental. En todos los casos se realizó una expansión de la red inicial.

El enriquecimiento de funciones moleculares y procesos celulares aumentados o disminuidos en cada uno de los secretomas reconstruidos, se determinó mediante el aplicativo ClueGo de Cytoscape. El análisis se desarrolló con un kapa de 0,3, con un límite de significancia estadística de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) y un ajuste de Bonferroni para corregir el valor de p de los términos y grupos creados.

### **3.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL SECRETOMA DE LAS HASC Los**

TRATAMIENTOS CON LOS MC EVALUADOS EN LOS ENSAYOS FUNCIONALES, FUERON

NORMALIZADOS DE ACUERDO A LA CANTIDAD DE CÉLULAS QUE LOS PRODUJERON, TENIENDO EN

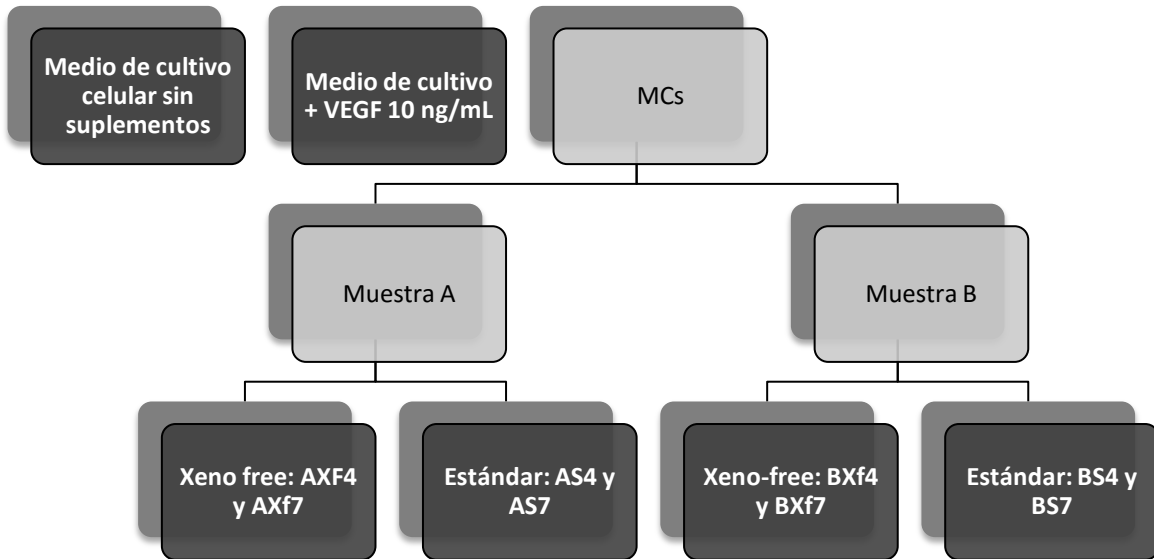
CUENTA LA DIFERENCIA QUE SE DOCUMENTÓ AL RESPECTO ENTRE LAS DOS CONDICIONES DE

CULTIVO EVALUADAS. POR LO ANTERIOR, LOS MC DE CÉLULAS PRODUCIDAS EN CONDICIONES XENO-FREE FUERON DILUIDOS HASTA OBTENER UN NÚMERO IGUAL DE CÉLULAS CONDICIONANDO CADA ML DE MC.

#### **3.4.1. MODELO IN VITRO DE ANGIOGÉNESIS: ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS EN MATRIGEL**

Con el fin de evaluar la capacidad que tienen los MCs de inducir la formación de tubos por parte de células endoteliales (Kinnaird, et al., 2004a), se utilizó un protocolo ya descrito por Aranda y Owen (2009) (Aranda, et al., 2009). Durante 6, 12 y 24 horas, 15000 células de una línea endotelial (EA.hy926, ATCC<sup>®</sup> CRL-2922) fueron cultivadas en los diferentes MCs, después de sembrarlas en pozos de 3.2 mm<sup>2</sup>, a los cuales previamente se les había cubierto su fondo con matrigel reducido en factores de crecimiento. Los grupos experimentales de este ensayo fueron los mismos del arreglo de anticuerpos, además de un control positivo (OptiMEM suplementado con 10 ng/ml de VEGF) (Fig. 2.2)

Cada condición experimental fue evaluada por triplicado mediante fotografías obtenidas con un microscopio de contraste de fases. Los resultados fueron caracterizados con la herramienta *Angiogenesis Analyzer* para el paquete informático ImageJ (Carpenter, 2012).

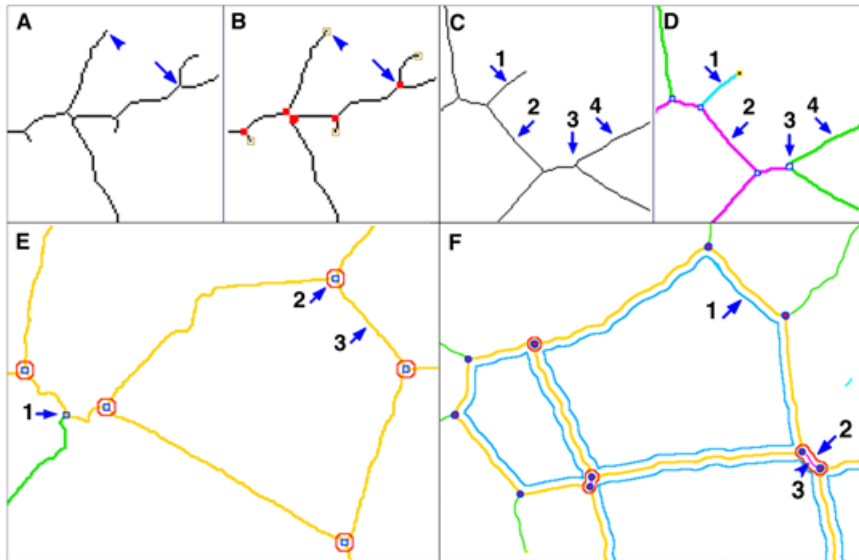


**Figura 3.2. Grupos experimentales para el ensayo in vitro de angiogénesis.**

Considerando que con este ensayo se pretende evaluar la capacidad que los MCs tienen de inducir la formación de redes que simulen sistemas capilares, se evaluaron los siguientes aspectos que brindan una idea estructural de menor a mayor complejidad en el proceso de organización de la red de células EA.hy926:

- Elementos aislados: Líneas de píxeles no ramificados.
- Extremidad: Segmento terminal derivado de un nodo Fig. 5: Cabezas de flecha en A y B)
- Nodos: Un pixel con tres más conectados a él (bifurcación, Fig. 5: Flechas en A y B).
- Uniones: Dos o más nodos cercanos entre sí, o nodos fusionados Figura 3.3: C3 y D3).
- Segmento: Elementos delimitados por dos nodos Figura 3.3: C2 y D2).

- Rama: Elemento delimitado por una unión y una extremidad.
- Segmento maestro: Fragmento de red compuesto por dos segmentos que se unen formando una estructura cerrada (Figura 3.3: E3).
- Uniones maestras: Uniones que conectan al menos tres segmentos maestros (Figura 3.3: E2). Dos uniones maestras pueden unirse (Figura 3.3: F2).
- Redes: Porciones de área rodeadas por segmentos maestros (Fig. 5: F1).



**Figura 3.3. Elementos constitutivos en una red de capilares formada por células endoteliales sobre una matriz de matrigel (CARPENTIER, 2012)**

### 3.4.2. MODELO *EX VIVO*: EXPLANTES DE ANILLOS DE AORTA

Para evaluar la capacidad pro-angiogénica de los diferentes MCs en un modelo *ex vivo*, se utilizó el protocolo reportado por Baker et al., 2012 (Baker, et al., 2012). Anillos de aorta torácica de ratones BALB/c de 12 semanas de edad, se sembraron en pozos de 3.2 mm<sup>2</sup> que previamente se les cubrió su fondo con colágeno tipo I (1 mg/ml). Después de incubar durante 30 minutos a 37°C para que el colágeno gelificara, se agregaron 100 µl de MC de



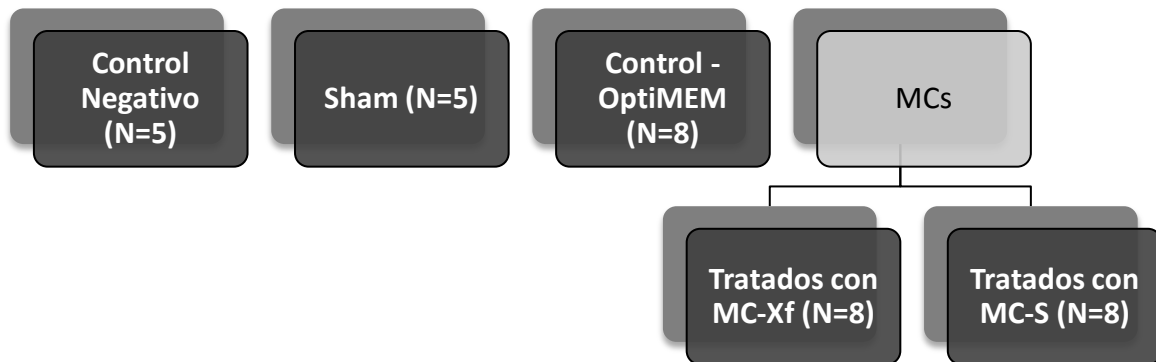
cada una de las condiciones objeto de estudio. Los resultados fueron caracterizados con la aplicación AquaL (Boettcher, et al., 2010), mediante la cual se cuantificaron los brotes angiogénicos y la longitud de los vasos sanguíneos emergentes desde un punto aleatorio del explante. Los grupos experimentales de este ensayo fueron los mismos considerados en el ensayo in vitro de angiogénesis.

### **3.4.3. MODELO IN VIVO**

Este experimento se desarrolló en el Centro de Terapia Celular y Molecular de la Universidad Federal de Sao Paulo (CTCMol/UNIFESP), Brasil, bajo la tutoría del profesor Sang Won Han. Se utilizaron ratones BALB/c entre 10 y 12 semanas de edad que se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos así (Fig. 6): 1) Control (n= 5), 2) Sham (n= 5), 3) Grupo isquémico sin tratamiento (n= 8), 4) Grupo isquémico tratado con MC por células producidas en condiciones estándar (n= 8), 5) Grupo isquémico tratado con MC por células producidas en condiciones xeno-free (n=8). Para este experimento, se seleccionaron los MCs B4L y B4S como tratamientos experimentales, considerando la consistencia de los resultados logrados con estos MC en los ensayos in vitro y ex vivo. Cuatro alícuotas de 2 mL de cada uno de los MCs usados en este ensayo fueron liofilizados a -40°C en un liofilizador LabConco FreeZone 2.5 durante 12 horas con presiones de 100 a 133 mbar, usando el protocolo automático del equipo.

Siguiendo el protocolo reportado por Martins et al., 2014 (Martins, et al., 2014), previa anestesia por vía intraperitoneal con 80–100 mg/kg de Ketamina (100 mg/ml) y 4–6 mg/kg

de Xilazina (20 mg/ml), se indujo isquemia en el miembro posterior izquierdo mediante electro-coagulación de la arteria femoral (inmediatamente por debajo del origen de la arteria femoral profunda) a nivel del ligamento inguinal (Martins, et al., 2014).



**Figura 3.4. Grupos experimentales para el modelo animal de isquemia tisular periférica**

Para llevarlos hasta Sao Paulo, se liofilizaron los MC en el Laboratorio de Equipos comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Su calidad fue evaluada mediante la detección de las proteínas con el arreglo de anticuerpos en muestras liofilizadas, comparándolo con los resultados obtenidos con las mismas muestras no liofilizadas.

Se hizo seguimiento fotográfico de la extremidad isquémica durante 4 semanas, comparándola con la contralateral no intervenida, usando la tabla 3.2 para otorgarle un valor numérico a su apariencia.

**Tabla 3.2. Evaluación visual de la isquemia en miembros posteriores de ratón**

Grado de isquemia	Apariencia macroscópica de la extremidad
I	Sin signos necrosis
II	Extremidad pálida, retraída
III	Extremidad retraída, inutilizada
IV	Uñas negras y necrosis evidente en la extremidad

#### **3.4.3.1. Cuantificación de la fuerza y masa muscular.**

Cuatro semanas después de la inducción de isquemia, los animales se volvieron a anestésiar con las dosis reportadas anteriormente y se efectuó una incisión en la región calcánea de la extremidad intervenida, disecando el músculo gastrocnemio hasta exponer el tendón calcáneo que fue cortado en su punto de inserción ósea, dejando intacta las porciones proximales del músculo. El tendón se conectó a un transductor de fuerza, y el nervio ciático a un electrodo bipolar (Martins, et al., 2014). La fuerza de contracción muscular se cuantificó mediante la diferencia de tensión al estimular el músculo con una frecuencia de 60 Hz, durante 1 ms y con una amplitud de 5 V.

Después de cuantificar la fuerza del músculo, fue retirado completamente y pesado en una báscula analítica.

### **3.4.3.2. Análisis histológico.**

Los ratones se sacrificaron con sobredosis anestésica (al menos tres veces la dosis efectiva), se disecó y retiró el músculo gastrocnemio intervenido, se lavó y se pesó. El músculo se fijó durante 48 horas con formaldehído al 10%, fue cortado por la mitad y se incluyó en parafina para hacer coloración de rutina de Hematoxilina-Eosina (HE), en donde se evaluó la degeneración miofibrilar el edema y la fibrosis, siguiendo los parámetros presentados por Martins et al., 2014 (Martins, et al., 2014) (MARTINS, ET AL., 2014). Además se hizo coloración tricrómica de Mason para evaluar más específicamente la fibrosis muscular. Además se hizo tinción de inmunohistoquímica para evaluar la presencia de capilares con el marcador Anti-CD31 (*mbs302740*, Mybiosource).

### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados numéricos, fueron analizados por promedios +/- desviaciones estándar. Para todos los experimentos se hicieron modelos completamente al azar y un análisis de varianza por medio de ANOVA. Finalmente se hicieron comparaciones no planeadas con el test de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  fueron considerados como significativos



---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL LISADO PLAQUETARIO HUMANO

El protocolo habitualmente usado para la producción de lisado plaquetario, consiste en la lisis de plaquetas mediante su congelación y descongelación junto con una importante cantidad de plasma que lógicamente contiene grandes cantidades de fibrinógeno. El producto obtenido con este protocolo, ha demostrado que puede ser usado como sustituto del FBS para el cultivo celular, después de agregarle un anticoagulante como Heparina, debido a que el fibrinógeno incluido en él forma coágulos de fibrina a 37°C. (Doucet, et al., 2005, Griffiths, et al., 2013, Jonsdottir-Buch, et al., 2013, Schallmoser, et al., 2007).

Se produjeron dos muestras de hPL (cada una a partir de 10 unidades diferentes de plaquetas) para evaluar el producto obtenido con la modificaciones hechas por nosotros, al protocolo habitual de producción de hPL. Ambas muestras de hPL presentaron apariencia translúcida y su concentración promedio de proteína fue de  $2.53 \pm 0.28$  mg/mL.

Se ha sugerido que la capacidad funcional del hPL como sustituto del FBS para el cultivo celular, depende de la concentración de factores de efecto trófico como PDGF-BB, TGF- $\beta$ , IGF y VEGF. Con el fin de determinar la concentración de estas y otras proteínas de efecto trófico en nuestros lisados, se utilizaron dos arreglos de proteínas neovascularizantes (Tab 4.1).

El primer resultado nos mostró que hay poca variación en la concentración relativa de las diferentes proteínas estudiadas entre las dos muestras de hPL, lo que sugiere que la herramienta utilizada cuenta con una buena reproducibilidad (Figs 4.1 y 4.2).

En ambas muestras de hPL se detectaron concentraciones cuantificables de enzimas (angiogenina, MMP-1 y MMP-9), factores de crecimiento (EGF, bFGF, PDGF-BB, VEGF-D y angiopoyetina 1), quimioquinas (CXCL-5, CCL-1, CCL-5, MCP-3 y MCP-4), citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6), citoquinas antiinflamatorias (IL-10) y citoquinas de la familia de CSF (G-CSF y GM-CSF) (Tab. 4.2).

De las 43 proteínas evaluadas con los arreglos de anticuerpos, no fue posible evidenciar concentraciones cuantificables de IGF-1, VEGF y endostatina en nuestros hPL. Las proteínas de mayor concentración en ambos preparados de hPL fueron EGF (0,42), PDGF-BB (0,42), Angiopoyetina 1 (0,45), CCL-5 (0,45), IL-10 (0,44) medidas en Unidades Arbitrarias (UA) por mg de proteína total. De otra parte, proteínas como (Tab. 4.2). De otra parte, proteínas como TGF- $\beta$ 1 (0,15), IFN- $\gamma$  (0,08), IL-2 (0,16), IL-4 (0,07), IL-6 (0,13), THPO (0,07), PECAM-1 (0,19), Tie-2 (0,03), VEGFR2 (0,15), VEGFR3 (0,09), Angiostatina (0,16), fueron detectadas pero en bajas concentraciones.

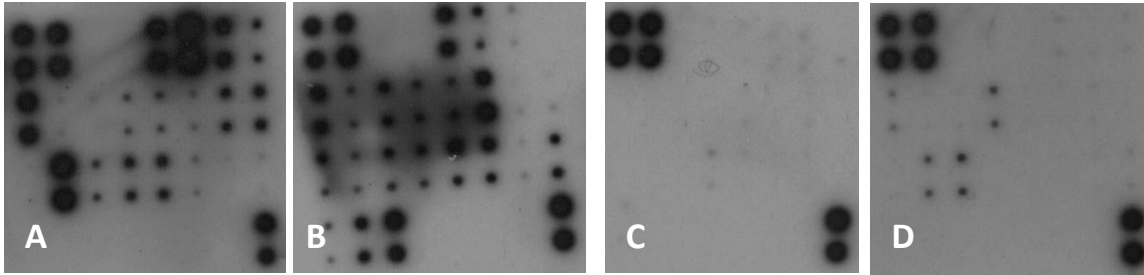
**Tabla 4.1. Factores de efecto paracrino involucrados en la regulación de la neovascularización, detectados con el arreglo de anticuerpos Human Angiogenesis Antibody Array C1000**

Pos	Pos	Neg	Neg	Angioge	EGF	CXCL5	bFGF
Pos	Pos	Neg	Neg	Angioge	EGF	CXCL5	bFGF
GRO	IFN- $\gamma$	IGF-1	IL-6	CXCL-8	Leptina	CCL-2	PDGF-BB
GRO	IFN- $\gamma$	IGF-1	IL-6	CXCL-8	Leptina	CCL-2	PDGF-BB
PIGF	CCL-5	TGF- $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	THPO	VEGF-A	VEGF-D
PIGF	CCL-5	TGF- $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	THPO	VEGF-A	VEGF-D
Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Neg	Pos
Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Neg	Pos

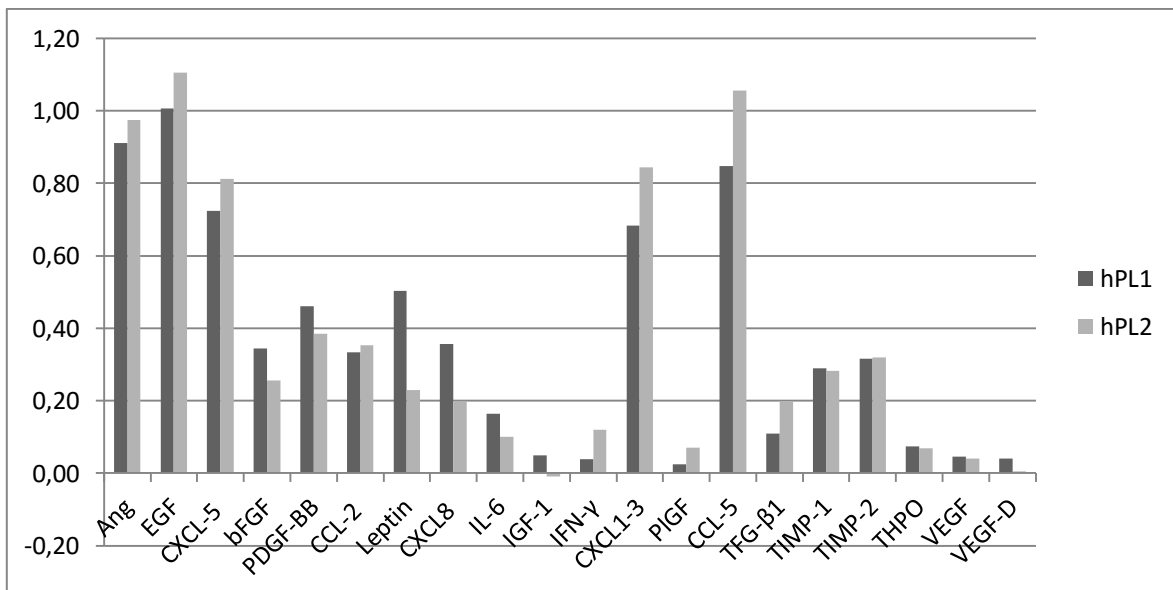
Pos	Pos	Neg	Neg	Angiopo1	Angiopo2	Angiostat	Endostat
Pos	Pos	Neg	Neg	Angiopo1	Angiopo2	Angiostat	Endostat
G-CSF	GM-CSF	CCL-1	IL-10	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL4
G-CSF	GM-CSF	CCL-1	IL-10	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL4
CXCL11	CCL7	CCL13	MMP1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF- $\alpha$
CXCL11	CCL7	CCL13	MMP1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF- $\alpha$
uPAR	VEGFR2	VEGFR3	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Pos
uPAR	VEGFR2	VEGFR3	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Pos

Distribución de los 64 campos en cada arreglo e identificación de la proteína detectada en cada caso (nombre alternativo). Neg: Control negativo, Pos: Control Positivo. EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico, CXCL1-3, 5, 8, 11 y 11: Quimioquinas de motivo CXC 1-3 (GRO), 5 (ENA-78), 8 (IL-8), y 11 (I-TAC), bFGF: Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos, IFN- $\gamma$ : Interferón  $\gamma$ , IGF-1: Factor de crecimiento 1 similar a la insulina, IL-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ), IL2, IL4, IL6, IL10: Interleuquinas, CCL-1, 2, 5, 7 y 13: Quimioquinas de motivo C-C1 (I-309), 2 (MCP-1), 5 (RANTES), 7 (MCP-3) y 13 (MCP-4), PDGF-BB: Isoforma BB del Factor de crecimiento derivado de plaquetas, PIGF: Factor de crecimiento placentario, TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante Beta (detecta solo la forma activa), TIMP-1 and 2: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas, THPO: Trombopoyetina, VEGF-A: Factor de crecimiento vascular endotelial (reconoce las variantes de 165 y 121), VEGF-D: Isoforma D del factor de crecimiento vascular endotelial, Angiopo1 y 2: Angiopoyetina 1 y 2, Angiostat: Angiostatina (PLG), Endostat: Endostatina, G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos, GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, MMP-1 y 9: Metaloproteinasas de la Matriz, PECAM-1: Molécula de adhesión de plaquetas y células endoteliales, Tie-2: Forma soluble del receptor de angiopoyetina, TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa, uPAR: Forma soluble del receptor de urokinasa plasminógeno, VEGFR2 and 3: Forma soluble del receptor de VEGF 2 y 3.





**Figura 4.1. Resultados de los arreglos de anticuerpos contra factores angiogénicos humanos del hPL y el FBS.** El hPL y el FBS fueron evaluados para la detección de 43 proteínas humanas incluyendo citoquinas, factores de crecimiento, proteasas y formas solubles de receptores, usando el Human Angiogenesis Antibody Array C1000 (RayBiotech, Norcross, GA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración relativa de cada proteína, fue calculada mediante densitometría de la quimioluminiscencia detectada con las placas radiológicas, en cada campo correspondiente en proporción al control positivo. (A) hPL, Array 1. (B) hPL, array 2. (C) FBS, Array 1. (D) FBS, Array 2.



**Figura 4.2. Correlación de la concentración relativa (unidades arbitrarias/mg de proteína) de las proteínas estudiadas con el primer arreglo de anticuerpos en las dos muestras de hPL estudiadas.**

Tabla 4.2. Concentración relativa de los factores angiogénicos detectados en el hPL con el Human Angiogenesis Antibody Array.

Factor	(UA/mg de proteína total)	Factor	(AU/mg de proteína total)
<b>Enzimas</b>		<b>Citoquinas</b>	
Angiogenina	0,37	TGF- $\beta$ 1	0,15
MMP-1	0,39	GM-CSF	0,33
MMP-9	0,27	G-CSF	0,39
<b>Factores de crecimiento</b>		TNF- $\alpha$	0,39
EGF	0,42	IFN- $\gamma$	0,08
bFGF	0,30	IL1 $\beta$	0,32
PDGF-BB	0,42	IL1 $\alpha$	0,28
VEGF	0,00	IL2	0,16
VEGF-D	0,04	IL4	0,07
Angiopoyetina 1	0,40	IL6	0,13
Angiopoyetina 2	0,45	IL10	0,44
PIGF	0,05	THPO	0,07
IGF-1	0,00	<b>Moléculas de adhesión y receptores</b>	
<b>Quimioquinas</b>		PECAM-1	0,19
CCL1 (I-309)	0,31	uPAR	0,20
CCL2 (MCP-1)	0,34	Tie-2	0,03
CCL5 (RANTES)	0,45	VEGFR2	0,15
CCL7 (MCP-3)	0,37	VEGFR3	0,09
CCL13 (MCP-4)	0,40	<b>Factores anti-angiogénicos</b>	
CXCL1-3 (GRO)	0,36	TIMP-1	0,29
CXCL5 (ENA-78)	0,37	TIMP-2	0,32
CXCL8 (IL-8)	0,28	Angiostatina	0,16
CXCL11 (I-TAC)	0,39	(PLG)	
<b>Hormonas</b>		Endostatina	0,00
Leptina	0,37		

Los valores en la tabla indican las concentraciones relativas (Unidades Arbitrarias/mg de proteína total en los hPL). MMP-1 y 9: Metaloproteinasas de la Matriz, EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico, bFGF: Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos, PDGF-BB: Isoforma BB del Factor de crecimiento derivado de plaquetas, VEGF: Factor de crecimiento vascular endothelial, VEGF-D: Isoforma D del factor de crecimiento vascular endothelial, PlGF: Factor de crecimiento placentario, IGF-1: Factor de crecimiento 1 similar a la insulina, CCL1, 2, 5 y 7: Quimioquinas de motivo C-C2, 5 y 7, CXCL1-3, 5, 8, 11 y 11: Quimioquinas de motivo CXC1-3, 5, 8, y 11, TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante Beta, GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos, TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa, IL-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ), IL2, IL4, IL6, IL10: Interleuquinas, THPO: Trombopoyetina, PECAM-1: Molécula de adhesión de plaquetas y células endoteliales, uPAR: Forma soluble del receptor de urokinasa plasminógeno, TIMP-1 and 2: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas, Tie-2: Forma soluble del receptor de angiopoyetina, VEGFR2 and 3: Forma soluble del receptor de VEGF 2 y 3.

## 4.2. PRODUCCIÓN XENO-FREE DE LAS hASC

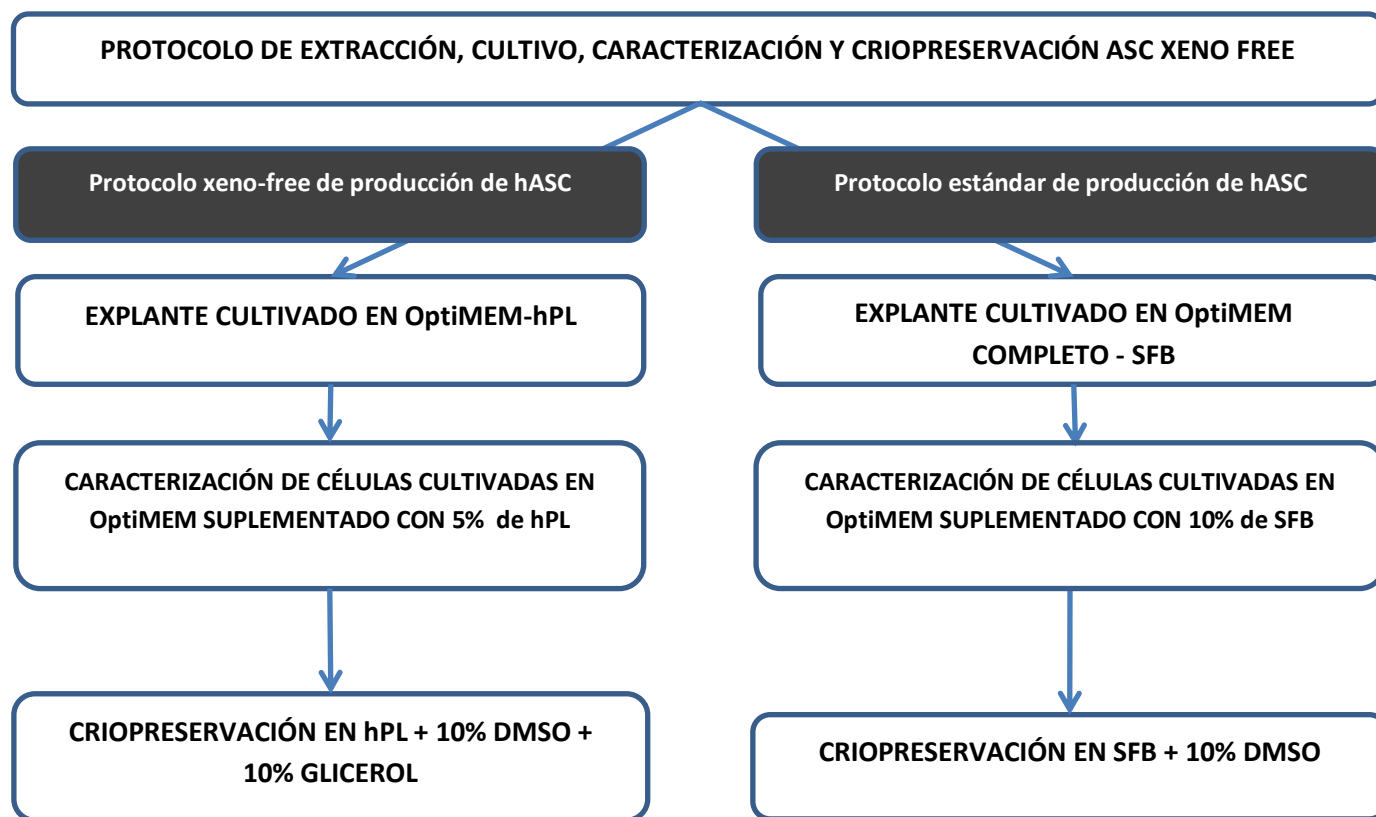
Usando los hPL producidos y caracterizados, se desarrolló un protocolo de producción xeno-free para las hASC. En la figura 4.3 se presenta la comparación del esquema del protocolo de producción xeno-free para las hASCs desarrollado por nosotros (usando hPL como suplemento) y el protocolo estándar de producción de hASCs (usando FBS como suplemento).

Para evaluar los resultados obtenidos con nuestro protocolo de producción celular, estudiaron las células obtenidas a partir de cuatro muestras de tejido adiposo humano abdominal, obtenido mediante lipectomía de pacientes que serían llevados a liposucción electiva. Las cuatro muestras fueron denominadas AT01-04 (*Adipose Tissue*).

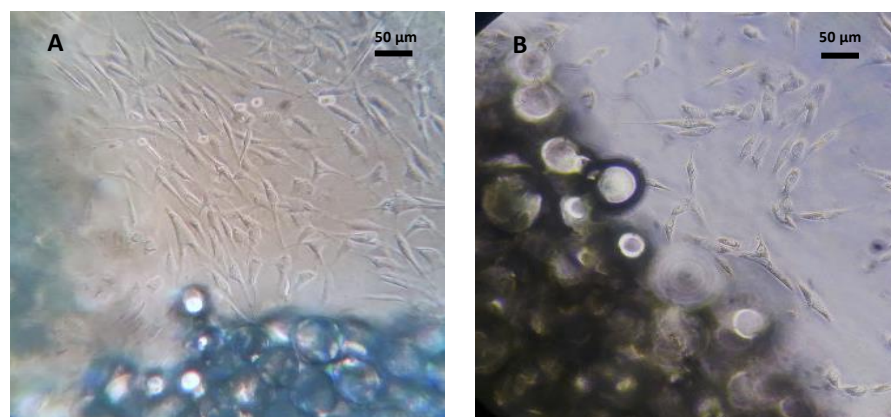
#### 4.2.1. EXTRACCIÓN Y CULTIVO.

Cultivando los explantes de tejido adiposo abdominal humano, fue posible obtener hASC a partir de las cuatro muestras estudiadas, lo cual sugiere que esta es una técnica efectiva y reproducible para la obtención de hASC. En los explantes cultivados bajo condiciones xeno-free, se evidenció la proliferación de células ahusadas de aspecto fibroblastoide a partir de los seis días de cultivo, mientras que con los explantes cultivados en bajo condiciones estándar esta proliferación se observó a partir del cuarto día de cultivo (Fig. 4.4).

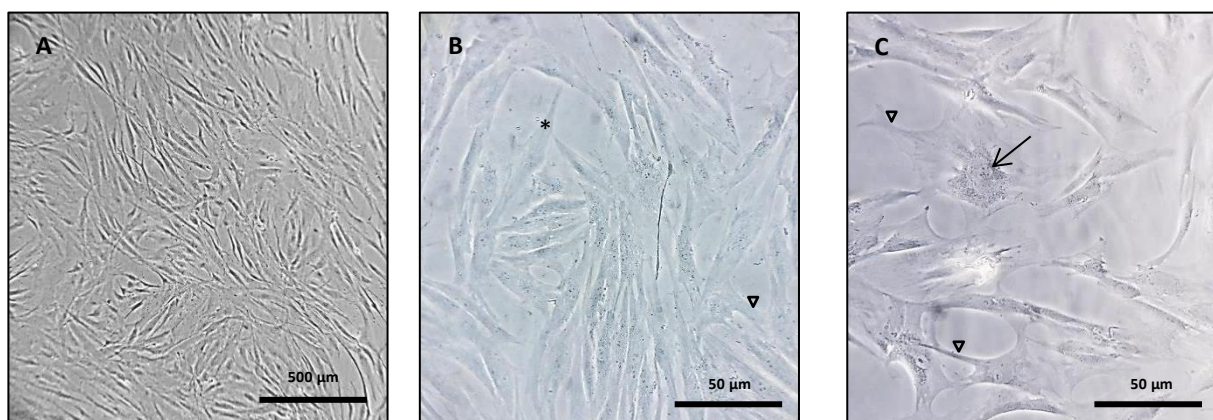
Las hASC fueron recuperadas del cultivo de explantes y fueron sembradas en cajas de 75 cm<sup>2</sup>. Después de recuperarlas, ambas poblaciones celulares (cultivadas bajo condiciones xeno-free y estándar) conservaron su adherencia al plástico y apariencia ahusada evidenciadas durante el cultivo de los explantes (Fig. 4.5). Sin embargo, las células cultivadas bajo condiciones estándar aumentaron su tamaño a medida que aumentaba su fase celular. Los análisis comparativos de proliferación mostraron que ésta fue significativamente superior en las células xeno-free después de dos días de cultivo (Fig. 4.6). No se evidenciaron diferencias entre las cuatro muestras estudiadas (AT01-04).



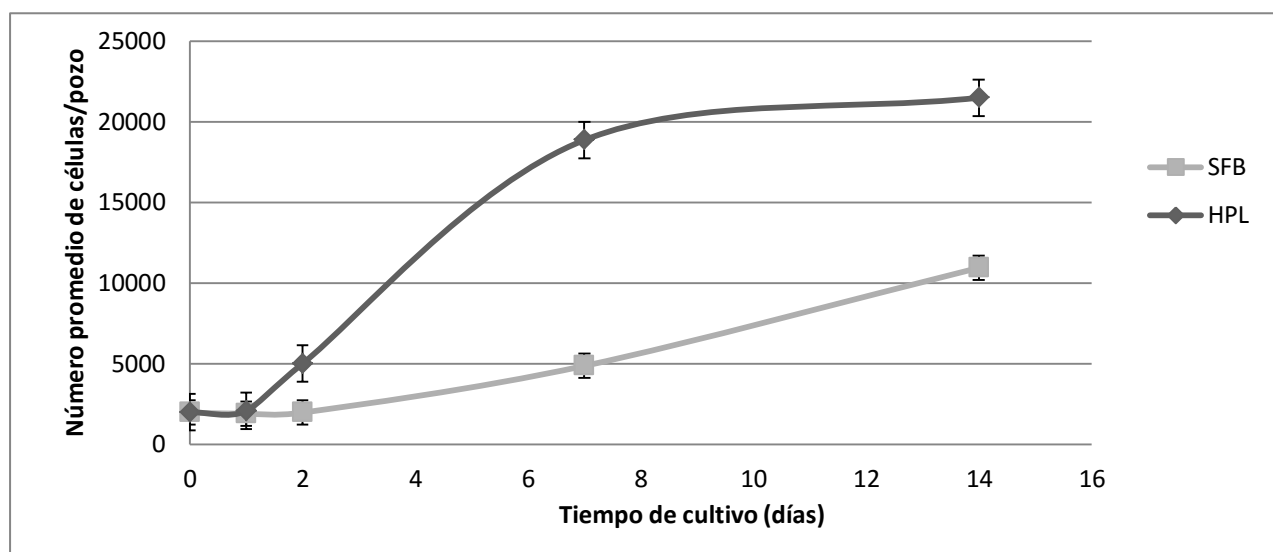
**Figura 4.3.** Flujograma de trabajo para la producción xeno-free de hASC. Se presenta de manera paralela la extracción, cultivo, caracterización y criopreservación de las ASC en condiciones xeno-free y condiciones estándar.



**Figura 4.4. Proliferación de las ASC a partir del explante de tejido adiposo.** A: Aspecto del explante dos semanas después de ser cultivado bajo condiciones xeno-free (OptiMEM suplementado con hPL). Se observan células de forma ahusada en una densidad del 60%. B: Aspecto del explante dos semanas después de ser cultivado bajo condiciones estándar (OptiMEM suplementado con FBS).



**Figura 4.5. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC) de cuarto pase.** A y B hASC cultivadas bajo condiciones xeno-free. A. Aspecto de la población celular donde se observan células ahusadas a una densidad del 80%. B. Aspecto microscópico de las células (\*), donde se observan sus proyecciones características (cabeza de flecha) y su núcleo central (flecha) C. hASC cultivadas en bajo condiciones estándar, donde se observa su núcleo central (flecha) y sus proyecciones características (cabeza de flecha).



**Figura 4.6. Proliferación de hASC en monocapa, cultivadas bajo condiciones xeno-free y estándar.** Los valores corresponden al promedio de tres réplicas de hASC cultivadas en OptiMEM-hPL o OptiMEM-FBS.

Después de 7 días de cultivo, las hASC cultivadas en OptiMEM-hPL completaron 3.24 doblajes poblacionales mientras que las hASC cultivadas en OptiMEM-FBS solo alcanzaron 1.26 doblajes poblacionales. Durante ese período, el tiempo de doblaje poblacional de las células cultivadas bajo condiciones xeno-free, fue de 2.16 días y 5.65 días para las células cultivadas en bajo condiciones estándar (Fig 4.6).

#### 4.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO

La expresión de marcadores de superficie como CD90, CD73 o CD105 es uno de los principales criterios de caracterización de las MSC. Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión de los marcadores habitualmente usados para la identificación de MSC humanas (Tab. 3.1), después de seleccionar una población celular de alta complejidad y tamaño.

En al menos 10.000 eventos analizados independientemente para cada marcador, pudo comprobarse que las células cultivadas bajo condiciones xeno-free expresan CD73 en un 96.77%, CD90 en un 99.69%, CD105 con un 98.43% y un 95,18% expresan HLA-ABC, sin expresar marcadores como CD34, CD45 y HLA-DR. Por su parte, las hASC cultivadas bajo condiciones estándar, también demostraron su inmunofenotipo característico, aunque la expresión de los marcadores positivos fue un poco menor, como fue el caso de CD105 (91,67%) (Figs. 4.7 y 4.8).

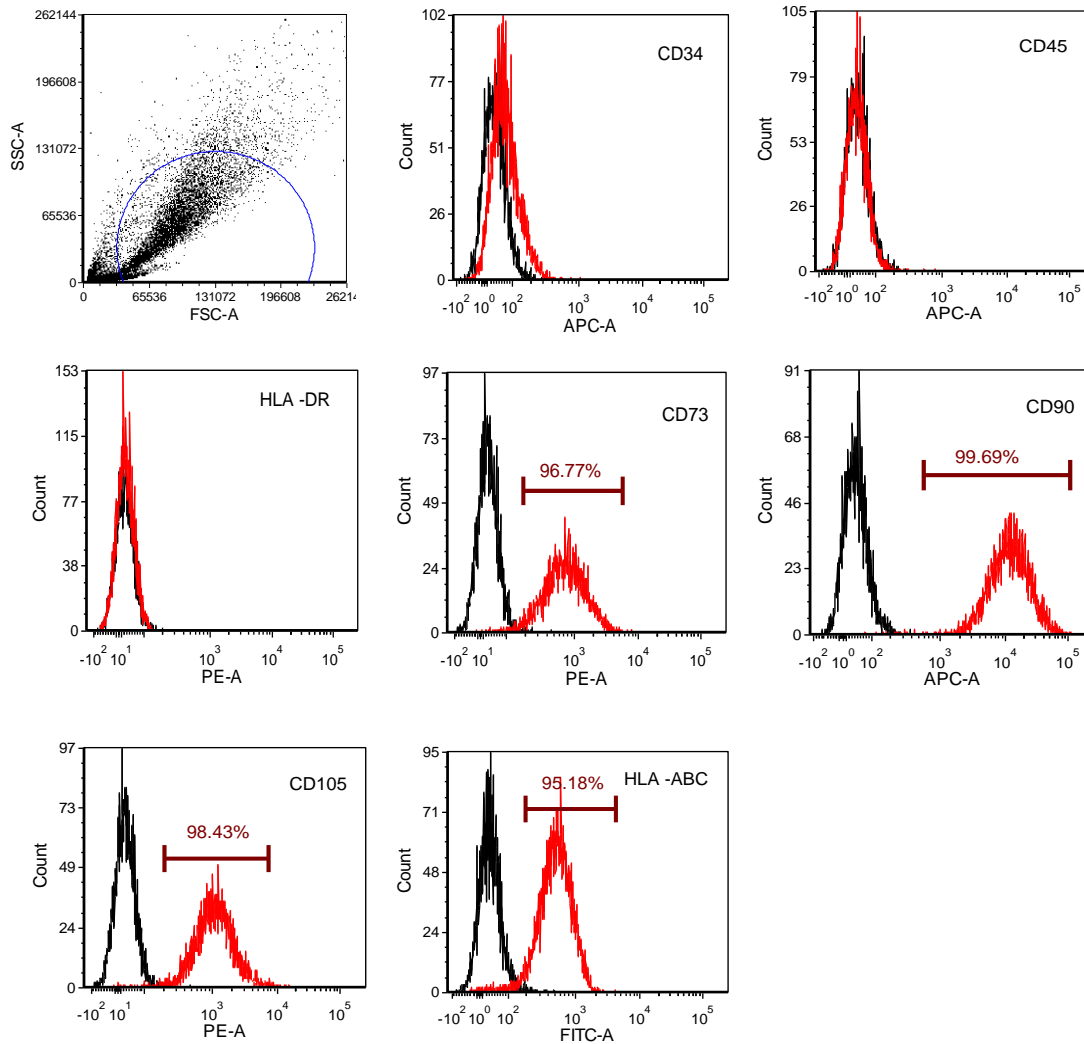
Una de las características prototípicas de las MSC, es su potencial de diferenciación, lógicamente este ha sido aceptado como uno de los criterios más importantes para su identificación. Las hASC cultivadas bajo ambas condiciones de producción celular (xeno-free y estándar) demostraron tener potencial de diferenciación adipogénico y osteogénico. Después de dos semanas de cultivo en medio inductor de diferenciación, las hASC desarrollaron depósitos intracelulares de lípidos o depósitos intersticiales de calcio,



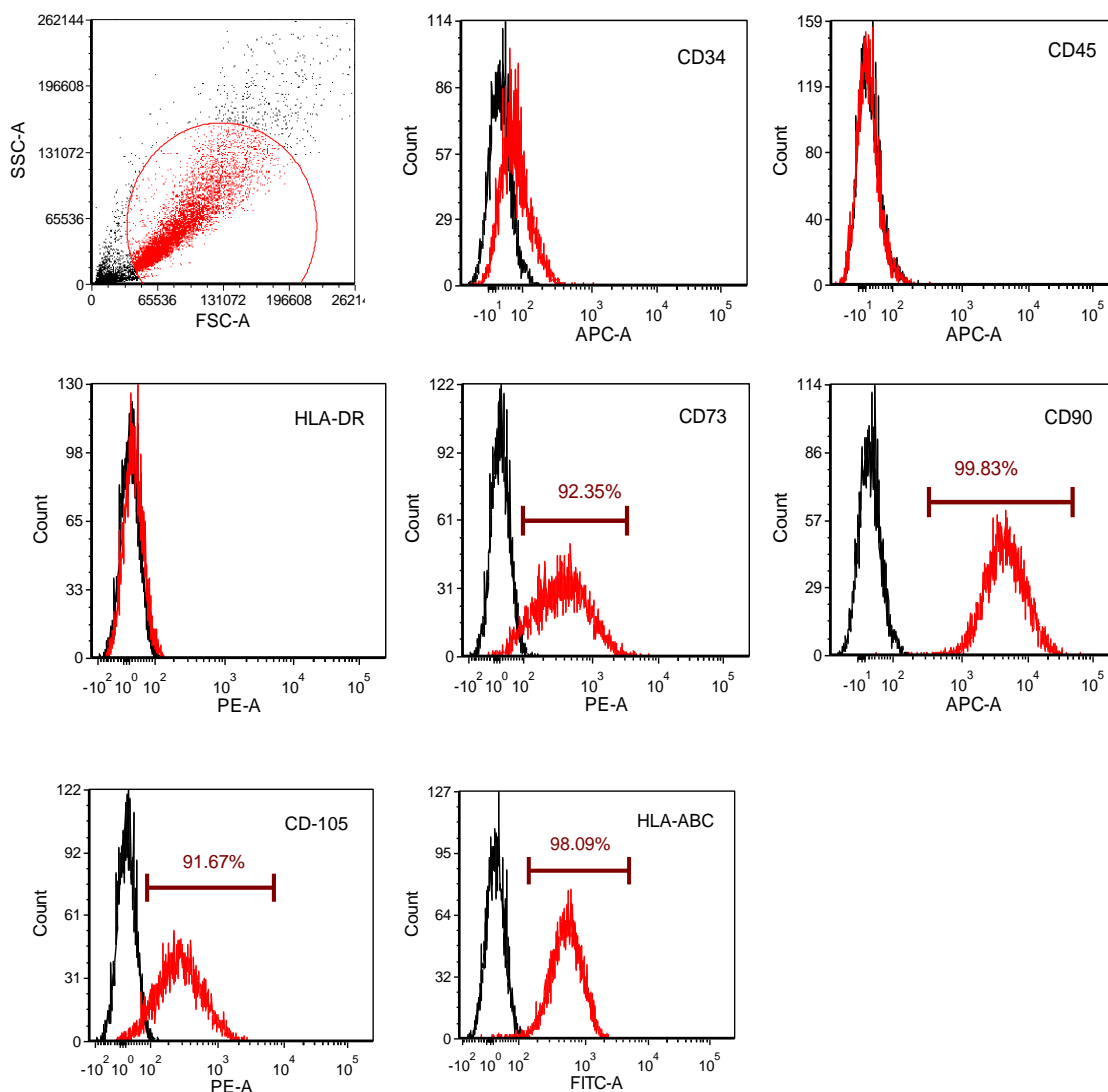
los cuales fueron teñidos con Aceite ojo O (diferenciación adipogénica) o Rojo de Alizarina (diferenciación osteogénica) (Figs. 4.9 y 4.10).

No obstante, se detectaron diferencias en la capacidad de diferenciación de las hASC xeno-free frente a las hASC estándar. Las hASC producidas en condiciones xeno-free demostraron un aumento significativo de capacidad de diferenciación osteogénica frente a las hASC producidas en condiciones estándar ( $p = 0.00001$ ), mientras que las hASC producidas en condiciones estándar demostraron una significativamente mayor capacidad de diferenciación adipogénica ( $p = 0.003$ ).

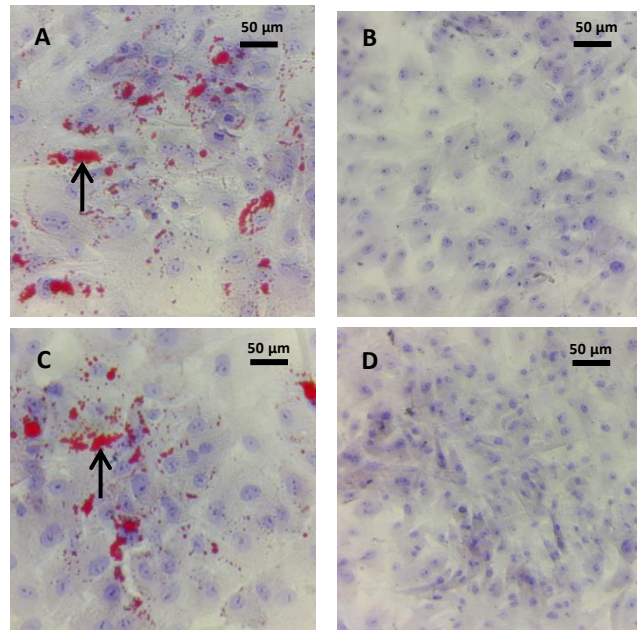
En la figura 4.11 se presentan ejemplos de las imágenes de diferenciación osteogénica y adipogénica antes y después de ser analizadas mediante densitometría con el software ImageJ, y en la figura 4.12 se presenta el resultado de ese análisis.



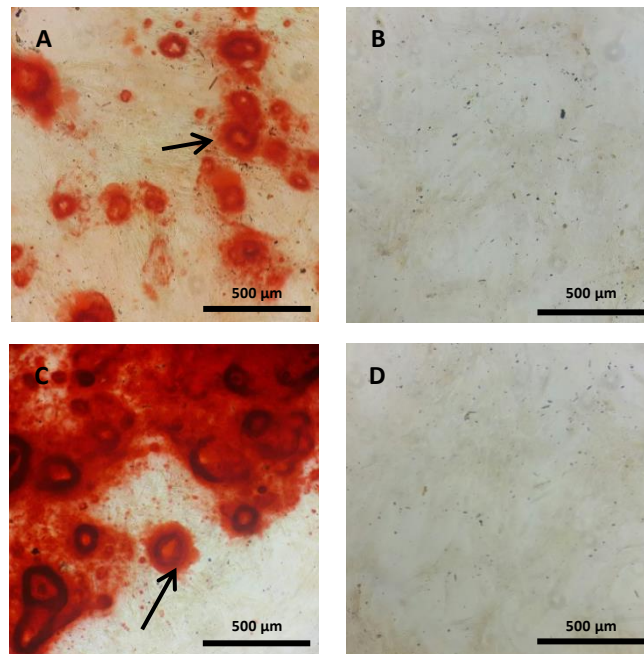
**Figura 4.7. Inmunofenotipificación de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free.** Histogramas de una citometría de flujo de hASC de cuarto pase celular, incubadas con anticuerpos monoclonales CD34-APC, CD45-RPECy5, HLA II-RPE, CD73-PE, CD90-APC, CD105-PE, HLA I-FITC o su respectivo control de isotipo. Se evidencia la expresión de marcadores positivos (CD73, CD90, CD105 y HLA-ABC), y la ausencia de expresión de marcadores negativos (CD34, CD45 y HLA-DR).



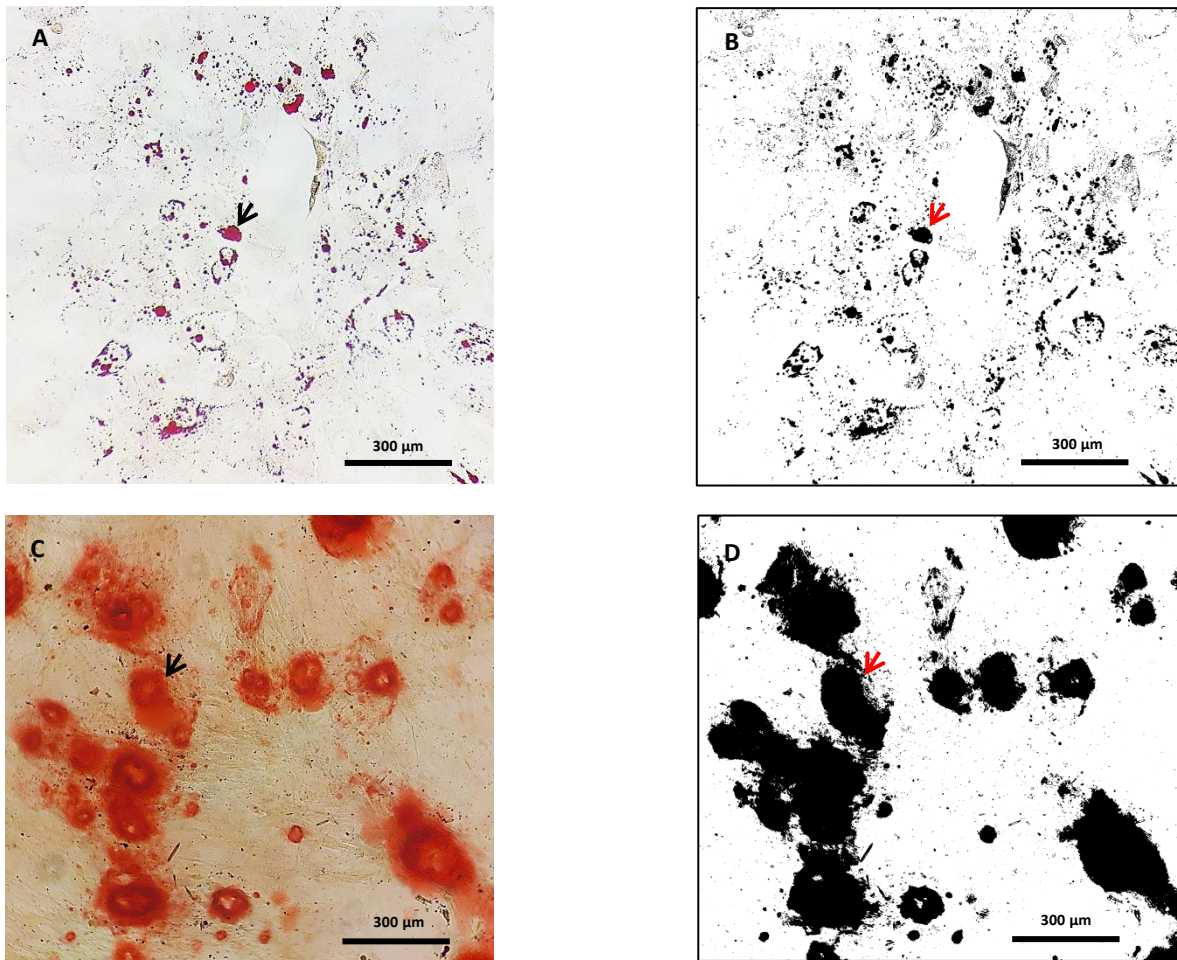
**Figura 4.8. Immunofenotipificación de las hASC producidas bajo condiciones estándar.** Histogramas de una citometría de flujo de hASC de cuarto pase celular, incubadas con anticuerpos monoclonales CD34-APC, CD45-RPEy5, HLA II-RPE, CD73-PE, CD90-APC, CD105-PE, HLA I-FITC o su respectivo control de isotipo. Se evidencia la expresión de marcadores positivos (CD73, CD90, CD105 y HLA-ABC), y la ausencia de expresión de marcadores negativos (CD34, CD45 y HLA-DR).



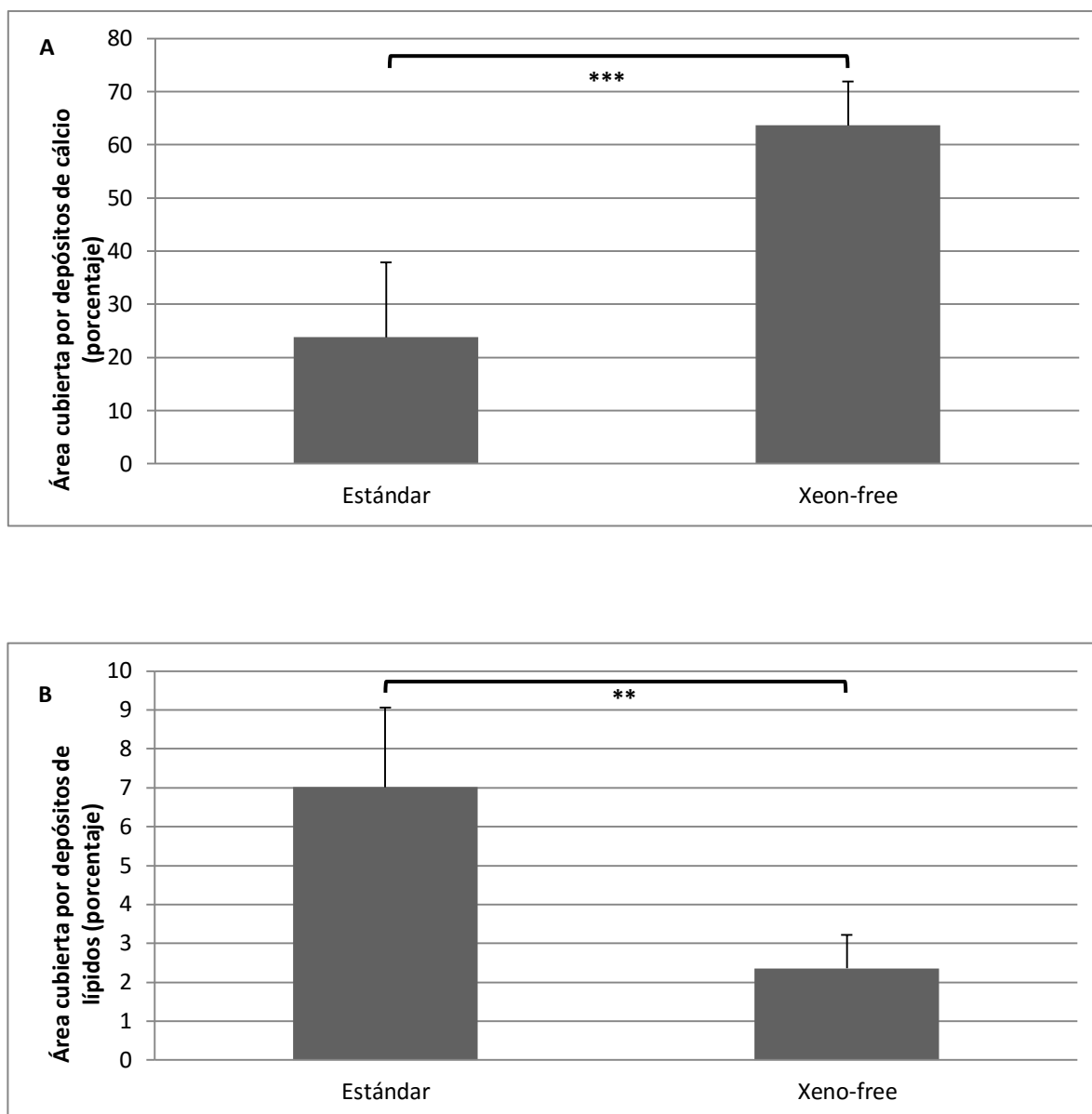
**Figura 4.9. Diferenciación adipogénica de las hASCs.** hASC cultivadas durante dos semanas en medio de diferenciación adipogénica teñidas con aceite rojo O para detectar los depósitos intracelulares de lípidos (flechas). Todos los experimentos ( $n = 4$ ) fueron desarrollados por triplicado. Diferenciación adipogénica de hASC producidas en condiciones estándar (A) y su control negativo (B). Diferenciación adipogénica de hASC producidas en condiciones xeno-free (C) y su control negativo (D). Contraintinción con hematoxilina.



**Figura 4.10. Diferenciación osteogénica de las hASCs.** hASC cultivadas durante dos semanas en medio de diferenciación osteogénica teñidas con Alizarina roja para detectar los depósitos intersticiales de calcio. (flechas). Todos los experimentos ( $n = 4$ ) fueron desarrollados por triplicado. Diferenciación osteogénica de hASC producidas en condiciones estándar (A) y su control negativo (B). Diferenciación osteogénica de hASC producidas en condiciones xeno-free y su control negativo (D).



**Figura 4.11. Cuantificación de la diferenciación adipogénica y osteogénica de las hASC.** Ejemplos de imágenes de diferenciación adipogénica y osteogénica antes (A y C) y después (B y D) de ser analizadas mediante densitometría con el software ImageJ. A y B: Imágenes de células diferenciadas a linaje adipogénico. C y D imágenes de células diferenciadas a linaje osteogénico. Los depósitos intracelulares de lípidos (flecha en A) e intersticiales de calcio (flecha en C), son reconocidos por el software y convertidos en puntos de alta densidad (flechas en B y D).



**Figura 4.12. Cuantificación de la diferenciación osteogénica y adipogénica de las hASC.** Porcentaje de área cubierta por depósitos intersticiales de calcio teñidos con Alizarina roja (A) y depósitos intracelulares de lípidos teñidos con aceite rojo O (B) en hASC producidas en condiciones estándar y hASC producidas en condiciones xeno-free.

\*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$

#### 4.2.3. CRIOPRESERVACIÓN.

La criopreservación de MSC es un procedimiento usualmente requerido teniendo en cuenta que es muy difícil **sincronizar** el cultivo y la aplicación de las células, razón por la cual usualmente se requiere almacenarlas, garantizando que conserven su fenotipo hasta que puedan ser aplicadas.

Después de ensayar diferentes concentraciones de glicerol y DMSO, reconocidos agentes criopreservantes, como suplemento del hPL para la criopreservación de las células, se evidenció que los mayores porcentajes de viabilidad se obtuvieron utilizando glicerol y DMSO al 10% (cada uno) y hPL al 80% (Tab. 4.3). El promedio de viabilidad de las células extraídas de las cuatro muestras de tejido adiposo estudiadas, después de al menos cuatro semanas de criopreservación con las soluciones descritas, fue de 82,5% con la solución a base de hPL, frente a 72.5% obtenido con la solución control a base de FBS (Tab. 4.3).

**Tabla 4.3. Viabilidad celular de hASC criopreservadas durante al menos cuatro semanas bajo condiciones xeno-free y estándar.**

Muestra	Tiempo de criopreservación (% de Viabilidad)	
	SFB 90% + DMSO 10%	hPL 80% + DMSO 10% + Glicerol 10%
<b>AT01</b>	4 semanas (70 ±2%)	6 Semanas (85 ±5%)
<b>AT02</b>	9 semanas (75 ±5,5%)	9 Semanas (80 ±3.6%)
<b>AT03 (Muestra A)</b>	4 semanas (75 ±8.1%)	4 Semanas (80 ±3%)
<b>AT04 (Muestra B)</b>	6 Semanas (70 ±5.2%)	6 Semanas (85 ±4.6%)

Se presenta el promedio de la viabilidad celular obtenido después de criopreservar las células extraídas de las cuatro muestras de tejido abdominal utilizadas (AT01-04)



### 4.3. CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA, CUALITATIVA Y FUNCIONAL DEL SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE DE LAS hASC

#### 4.3.1. CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA DEL SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE DE LAS hASC

Es cada vez más abundante la evidencia que asocia la capacidad regenerativa de las MSC con su secretoma, y particularmente con su secretoma neovascularizante. Por esta razón caracterizamos cuantitativa, cualitativa y funcionalmente el secretoma neovascularizante de las hASC xeno-free, para así tener una idea del impacto funcional que la producción bajo estas condiciones podría tener sobre el potencial regenerador de las hASC.

Adicionalmente, evaluamos los cambios de este secretoma en respuesta al pase celular, toda vez que el cultivo in vitro de las hASC es un procedimiento indispensable para obtener la cantidad de células que usualmente se requieren para procedimientos terapéuticos de medicina regenerativa con MSCs.

Así las cosas, se comparó el secretoma neovascularizante de las hASC de cuarto y séptimo pase producidas bajo condiciones xeno-free y condiciones estándar de producción celular.

Teniendo en cuenta que se evaluó el secretoma neovascularizante de las células extraídas de dos muestras de tejido adiposo, se estableció una codificación para ellas de la siguiente manera: La primera letra (A o B) corresponde a la muestra, la (s) segunda (s) letra (s) (Xf o S) corresponde a las condiciones de producción celular (xeno-free o estándar), y el número (4 o 7) corresponde al pase celular.

Para los análisis del secretoma, fueron usadas las células extraídas de dos de las cuatro muestras de tejido adiposo usadas para el desarrollo del protocolo xeno-free de producción de hASC (AT03 y AT04), las cuales fueron denominadas como Muestra A y Muestra B respectivamente.

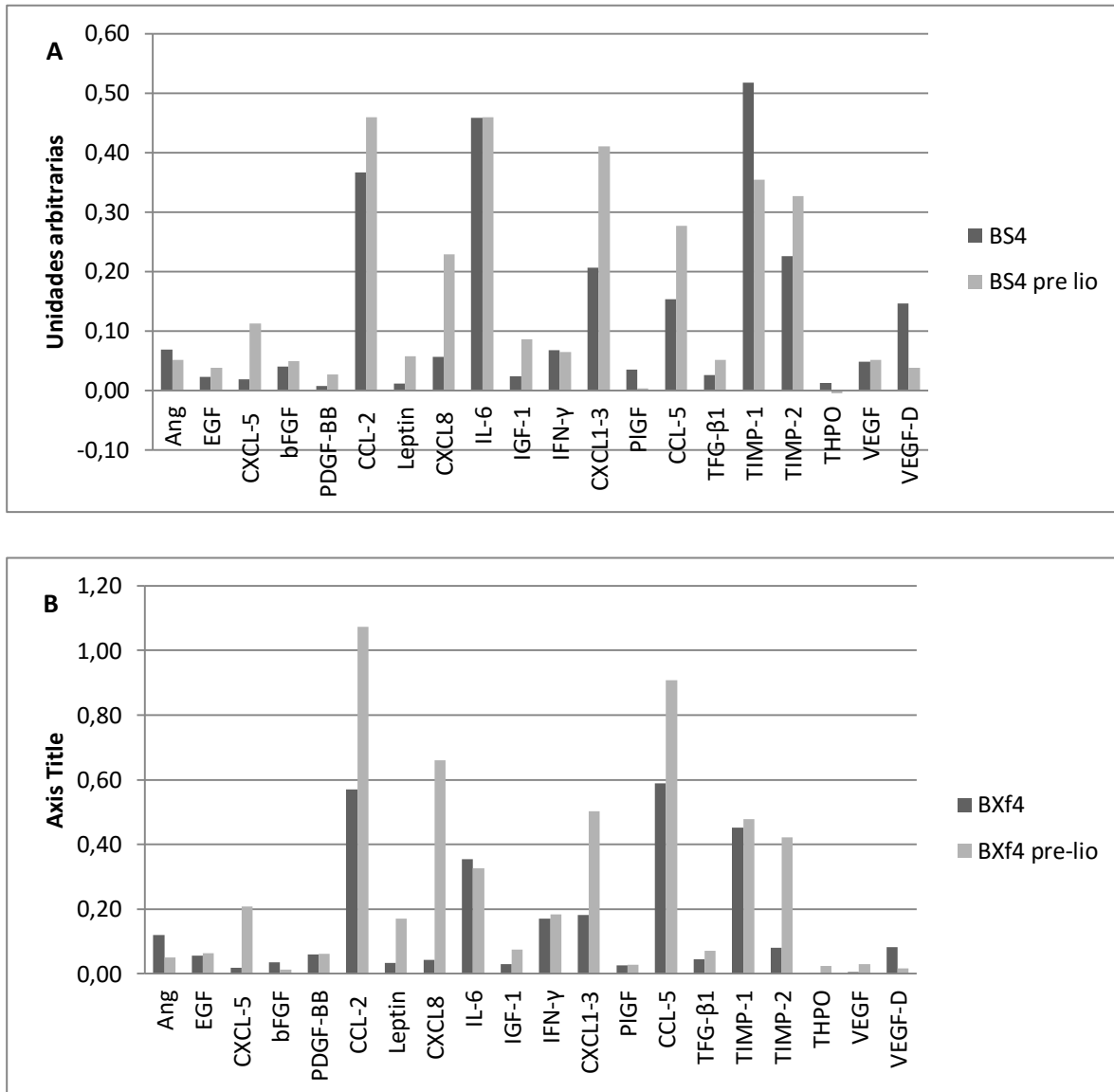
Con el fin de evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos con los arreglos de anticuerpos, las muestras de los medios condicionados (MC) BXF4 y BS4 fueron estudiadas dos veces con el primer arreglo de anticuerpos. En la figura 4.13 se presenta la comparación de la concentración relativa de estos factores angiogénicos en los MC mencionados, obtenida en dos momentos diferentes. Se encontró variación en la intensidad de detección de algunas proteínas en ambas muestras, lo cual puede tener alguna relación con el almacenamiento de los MC a -20°C durante seis meses o con variabilidad de la herramienta en sí. Con ambas muestras los campos de CXCL-5, CCL-2, leptina, CXCL-8, IFG-1, GRO, CCL-5, TGF- $\beta$ 1 y TIMP-2 presentaron mayor detección de la proteína, mientras que se redujo la detección de VEGF-D.

Los resultados del arreglo de anticuerpos con los MC-4S, se consideraron como el patrón de comparación para los demás. La concentración relativa promedio de los 43 factores evaluados, en los MC-S4 de ambas muestras, se presenta en la tabla 4.4.

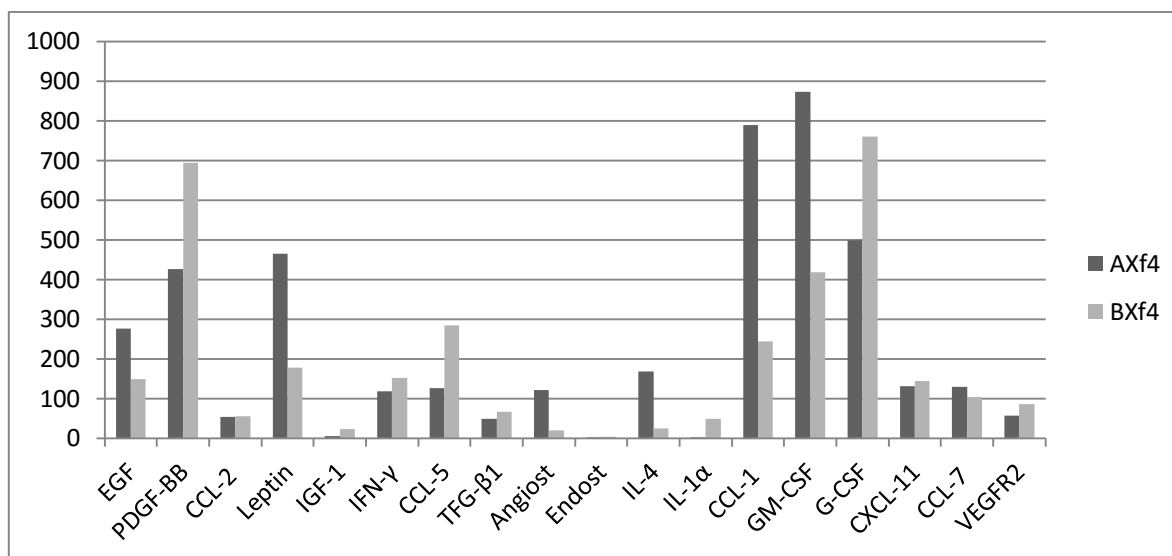
**Tabla 4.4. Concentración relativa promedio, de los factores angiogénicos detectados en los MC-S4 de ambas muestras con el Human Angiogenesis Antibody Array.**

<b>Factor</b>	<b>Unidades arbitrarias</b>	<b>Factor</b>	<b>Unidades arbitrarias</b>
<b>Enzimas</b>		<b>Citoquinas</b>	
Angiogenina	1,2	TGF- $\beta$ 1	0,7
MMP-1	1,1	GM-CSF	0,1
MMP-9	0,7	G-CSF	0,1
<b>Factores de crecimiento</b>		TNF- $\alpha$	0,5
EGF	0,2	IFN- $\gamma$	0,7
bFGF	0,3	IL1 $\beta$	0,4
PDGF-BB	0,1	IL1 $\alpha$	0,9
VEGF	0,5	IL2	0,3
VEGF-D	1,3	IL4	0,2
Angiopoyetina 1	0,6	IL6	6,1
Angiopoyetina 2	0,6	IL10	0,2
PIGF	0,2	THPO	0,3
IGF-1	0,5	<b>Moléculas de adhesión y receptores</b>	
<b>Quimioquinas</b>		PECAM-1	0,4
CCL1 (I-309)	0,2	uPAR	1,5
CCL2 (MCP-1)	4,0	Tie-2	0,8
CCL5 (RANTES)	1,8	VEGFR2	1,1
CCL7 (MCP-3)	0,4	VEGFR3	0,3
CCL13 (MCP-4)	0,3	<b>Factores anti-angiogénicos</b>	
CXCL1-3 (GRO)	3,4	TIMP-1	6,7
CXCL5 (ENA-78)	0,4	TIMP-2	3,2
CXCL8 (IL-8)	1,6	Angiostatina	2,2
CXCL11 (I-TAC)	0,6	(PLG)	
<b>Hormonas</b>		Endostatina	1,2
Leptina	0,1		

Los valores en la tabla indican las concentraciones relativas (Unidades Arbitrarias). MMP-1 y 9: Metaloproteinasas de la Matriz, EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico, bFGF: Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos, PDGF-BB: Isoforma BB del Factor de crecimiento derivado de plaquetas, VEGF: Factor de crecimiento vascular endothelial, VEGF-D: Isoforma D del factor de crecimiento vascular endothelial, PIGF: Factor de crecimiento placentario, IGF-1: Factor de crecimiento 1 similar a la insulina, CCL1, 2, 5 y 7: Quimioquinas de motivo C-C2, 5 y 7, CXCL1-3, 5, 8, 11 y 11: Quimioquinas de motivo CXC1-3, 5, 8, y 11, TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante Beta, GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos, TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa, IL-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ), IL2, IL4, IL6, IL10: Interleuquinas, THPO: Trombopoyetina, PECAM-1: Molécula de adhesión de plaquetas y células endoteliales, uPAR: Forma soluble del receptor de urokinasa plasminógeno, TIMP-1 and 2: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas, Tie-2: Forma soluble del receptor de angiopoyetina, VEGFR2 and 3: Forma soluble del receptor de VEGF 2 y 3.



**Figura 4.13. Concentración relativa de los factores neovascularizantes detectados con el primer arreglo de anticuerpos en los MC de la muestra B.** Se presenta la comparación de los resultados obtenidos en las dos réplicas efectuadas con los MCs de las células BS4 (A) y BXf4 (B).



**Figura 4.14. Proteínas que aumentaron su concentración en el secretoma de las hASC de cuarto pase celular en respuesta a la producción bajo condiciones xeno-free.** Porcentaje de aumento en el MC de las hASC de cuarto pase producidas bajo condiciones xeno-free de ambas muestras (A y B), en comparación con su concentración en el MC de las hASC producidas en condiciones estándar.

Se encontraron concentraciones cuantificables de los 43 factores evaluados, con el arreglo de anticuerpos. De ellos TIMP-1, IL-6, CCL-2 (MCP-1), CXCL1-3 (GRO), TIMP-2 y Angiostatina tuvieron las concentraciones más altas con valores de 0.67, 0.61, 0.4, 0.34, 0.32 y 0.22 unidades arbitrarias, respectivamente. Mientras tanto, las proteínas de menor concentración en los MC-4S fueron PDGF-BB, Leptina, GM-CSF y G-CSF, todos ellos con valores de 0.01 unidades arbitrarias.

La comparación cualitativa y cuantitativa del secretoma neovascularizante de las hASC de cuarto y séptimo pase celular, producidas bajo condiciones xeno-free y estándar, permitió obtener una primera idea del efecto fenotípico de las condiciones de producción celular y el pase celular, sobre las capacidades neovascularizantes de las hASC.

La comparación de los resultados del arreglo de anticuerpos obtenidos con ambas muestras, evidenció comportamientos contrarios entre ellas en respuesta tanto a las condiciones de cultivo como al pase celular.

La producción xeno-free hasta cuarto pase celular, se asoció con cambios contrarios entre muestras, respecto a las concentraciones relativas de proteínas como Angiogenina, bFGF, PlGF, Angiopoyetina 2, IL-2, IL1- $\beta$ , IL-10, CCL13, MMP-1, MMP-9, TNF- $\alpha$  y uPAR. De otra parte, la producción celular bajo condiciones xeno-free hasta séptimo pase, se asoció con cambios contrarios entre las muestras evaluadas respecto, a la concentración de proteínas como CCL-5, TGF- $\beta$ , TIMP-1, VEGF-D, Angiopoyetina 2, Endostatina, IL-2, IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ , CXCL-11, MMP-1, TNF- $\alpha$ , VEGFR2 y uPAR.

No obstante, se encontraron respuestas similares entre las muestras en relación a la secreción de un amplio grupo de moléculas como consecuencia de la producción xeno-free, lo cual permitió el análisis grupal que a continuación se presenta.

El análisis inicial, demostró que cada mL de MC-Xf4 (medio condicionado por hASC de cuarto pase, producidas bajo condiciones xeno-free) tiene mayor concentración de EGF, la hormona Leptina, las enzimas MMP-1 y MMP-9, las citoquinas IFN- $\gamma$ , GM-CSF y G-CSF, el factor anti-neovascularizante angiostatina (PLG), y las quimioquinas CCL-1 (I-309), CCL-5 (Rantes), CCL-7 (MCP-3) y CXL-11 (I-TAC) (Fig. 4.14), que el MC-S (medio condicionado por hASC de cuarto pase, producidas bajo condiciones estándar). No obstante, debe

considerarse que el MC-Xf fue condicionado por una mayor cantidad de células (cerca del doble) que el MC-S.

La normalización de la concentración relativa de las proteínas en función de la cantidad de células que condicionaron el medio, permite tener una idea del efecto que la producción xeno-free tiene sobre el secretoma de cada célula y esto brinda una idea del efecto fenotípico que la producción xeno-free tiene sobre ellas.

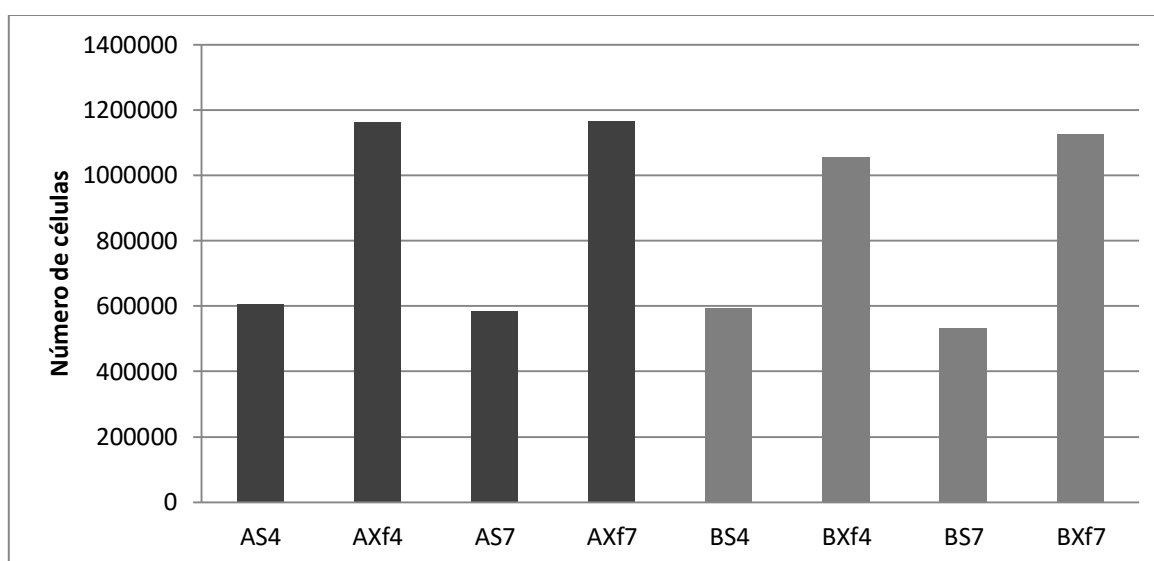
Como ya se mencionó, las hASC producidas en condiciones estándar aumentaron evidentemente su tamaño a medida que aumentaba su pase celular, fenómeno no presentado con las células cultivadas en condiciones xeno-free. Esta situación se reflejó en la cantidad de células que condicionaron los MCs, toda vez que el mayor tamaño de las células cultivadas en condiciones estándar, se correlacionó con la menor cantidad de células por unidad de superficie de cultivo, y por ende menor cantidad de células condicionando cada mL de MC.

En promedio de cada caja de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, se recuperaron 579.252 células cultivadas bajo condiciones estándar y 1.126.167 cultivadas bajo condiciones xeno-free. No se evidenciaron diferencias entre muestras, aunque si se detectó la disminución de la cantidad de células en respuesta al pase celular bajo condiciones estándar de cultivo (Fig. 4.15), lo cual podría correlacionarse con el aumento del tamaño celular.

Lo anterior equivale a que en promedio 144.813 células producidas bajo condiciones estándar, condicionaron cada mL del MC (MC-S) recolectado (16 mL), mientras que

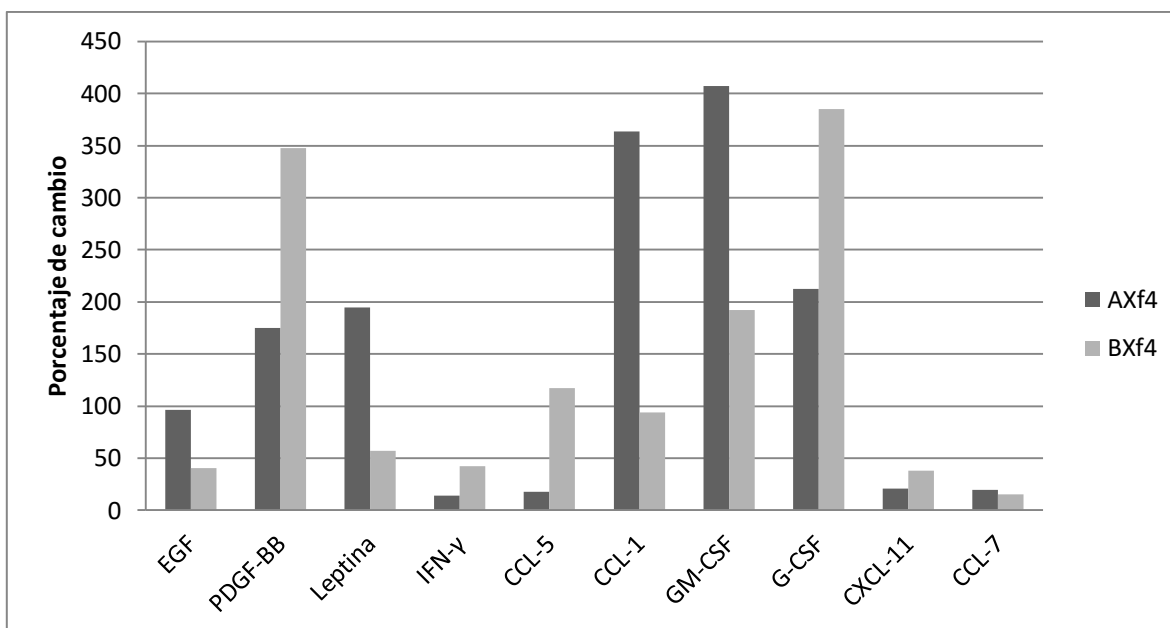
281.541 producidas bajo condiciones xeno-free, condicionaron cada mL del respectivo MC (MC-Xf).

Al normalizar en función de la cantidad de células que condicionaron el medio de cultivo (concentración relativa por millón de células), se encontró que las hASC producidas en condiciones xeno-free, aumentaron la secreción de EGF, PDGF-BB, Leptina, IFN-  $\gamma$ , CCL-1 (I-309), CCL-5, CCL-7 (MCP-3), GM-CSF, G-CSF, y CXCL-11 (I-TAC) (Fig. 4.16).



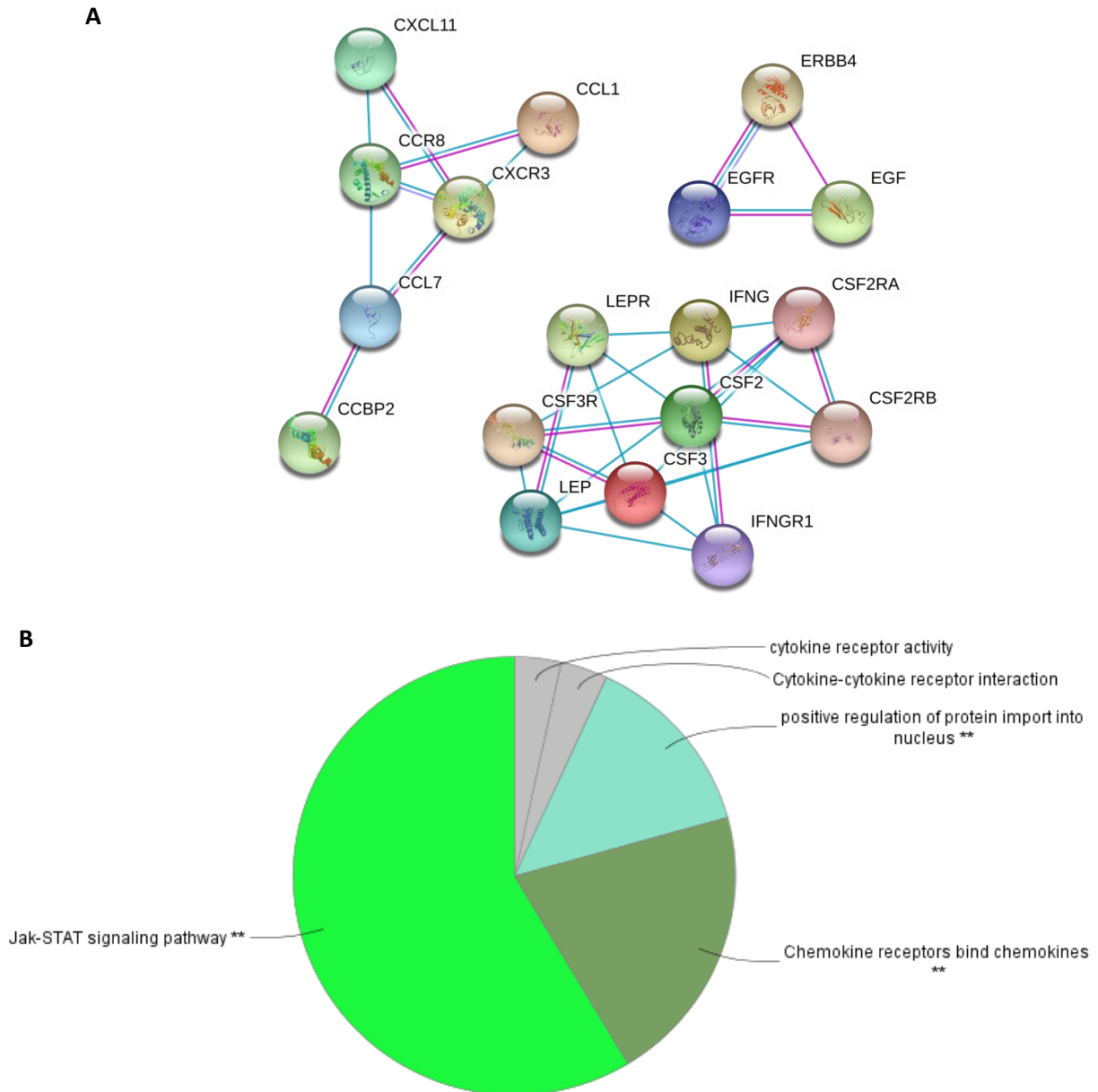
**Figura 4.15. Cantidad de células recuperadas de cada caja de cultivo después de obtener el MC.** Células recuperadas de cada caja de 75 cm<sup>2</sup> contadas mediante hemocitómetro.



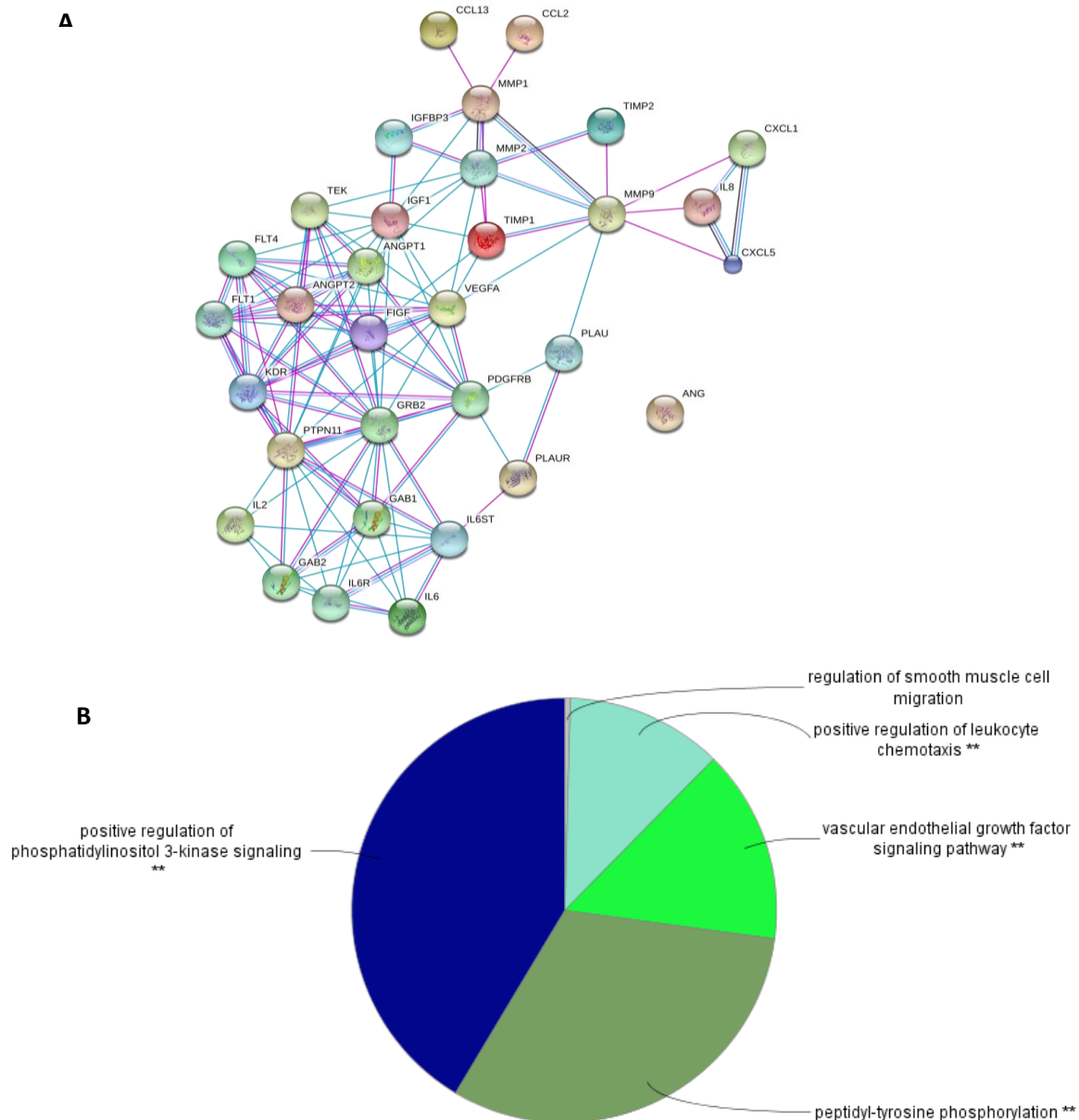


**Figura 4.16. Factores neovascularizantes que aumentaron su concentración relativa (por millón de células) en el MC de las hASC de cuarto pase en respuesta a la producción xeno-free.** Porcentaje de aumento de la concentración relativa en el MC de ambas muestras, en respuesta a la producción xeno-free de las hASC, frente a su concentración en el MC de las hASC producidas en condiciones estándar.

Con el fin de detectar los procesos biológicos y moleculares que pudieran estar activados o reprimidos en las hASC, en respuesta a cada una de las variables estudiadas (condiciones de producción y pase celular), se realizó la reconstrucción bioinformática de la red de asociación proteína-proteína del secretoma de las hASC. Este análisis evidenció que las hASC de cuarto pase producidas bajo condiciones xeno-free, tendrían aumento de la actividad de la vía molecular Jak/STAT, los sistemas de receptores para citoquinas y quimioquinas y los procesos de regulación de importación proteica al núcleo (Fig. 4.17).



**Figura 4.17. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que aumentaron su concentración en el MC de las hASC de cuarto pase producidas en condiciones xeno-free.** A. Reconstrucción estructural de la red de mutua asociación de las proteínas que aumentaron su concentración relativa en el secretoma de las hASC de cuarto pase producidas bajo condiciones xeno-free. Evidencia experimental (—) y de bases de datos (---). B. Enriquecimiento mediante anotación por GO en ClueGo, de las funciones moleculares y procesos celulares en los cuales participan las proteínas y las redes reconocidas en la reconstrucción estructural de la red.



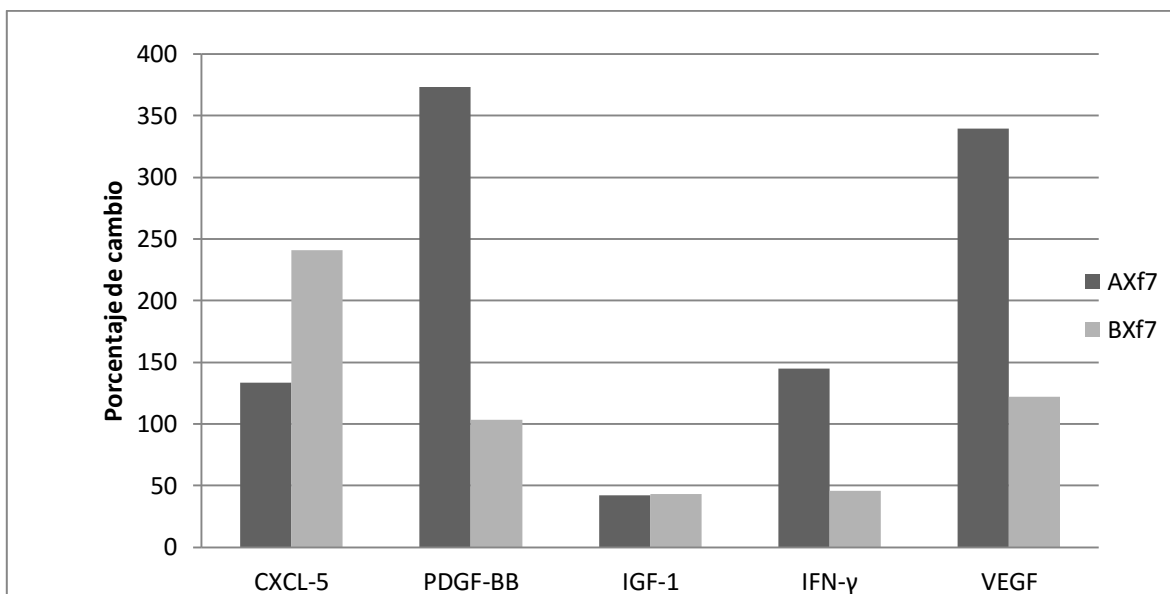
**Figura 4.18. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que disminuyeron su concentración en el MC de las hASC de cuarto pase producidas en condiciones xeno-free.** A. Reconstrucción estructural de la red de mutua asociación de las proteínas que disminuyeron su concentración relativa en el secretoma de las hASC de cuarto pase producidas bajo condiciones xeno-free. Evidencia experimental (—) y de bases de datos (—) y de coexpresión (—). B. Enriquecimiento mediante anotación por GO en ClueGo, de las funciones moleculares y procesos celulares en los cuales participan las proteínas y las redes reconocidas en la reconstrucción estructural de la red.

De otra parte, tendrían reprimida la vía molecular de la kinasa de fosfatidil-inositol 3 (*Phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), la actividad de sistemas de kinasas de tirosina, la actividad de la vía de señalización de VEGF y los procesos moleculares relacionados con la regulación positiva de la quimiotaxis de leucocitos (Fig. 4.18).

El efecto de la producción xeno-free sobre el secretoma de las hASC, se modificó con el pase celular. El MC-Xf de hASC de séptimo pase presentó mayor concentración de proteínas diferentes a las aumentadas en el MC-Xf de hASC de cuarto pase. Se encontró aumento de la concentración de los factores de crecimiento VEGF, IGF-1, PDGF-BB, la citoquina IFN- $\gamma$  y la quimioquina CXCL-5 (Fig. 4.19). Estas cinco proteínas están relacionadas con la modulación de vías moleculares de VEGF e IGF (Fig. 4.20). El análisis bioinformático de los 38 factores restantes que tuvieron menor concentración en el MC de las hASC xeno-free de séptimo pase, frente al MC de las hASC producidas en condiciones estándar, evidenció que estas células tendrían menor actividad de los sistemas moleculares de regulación de quimiotaxis y migración celular, especialmente de leucocitos (Fig. 4.21).

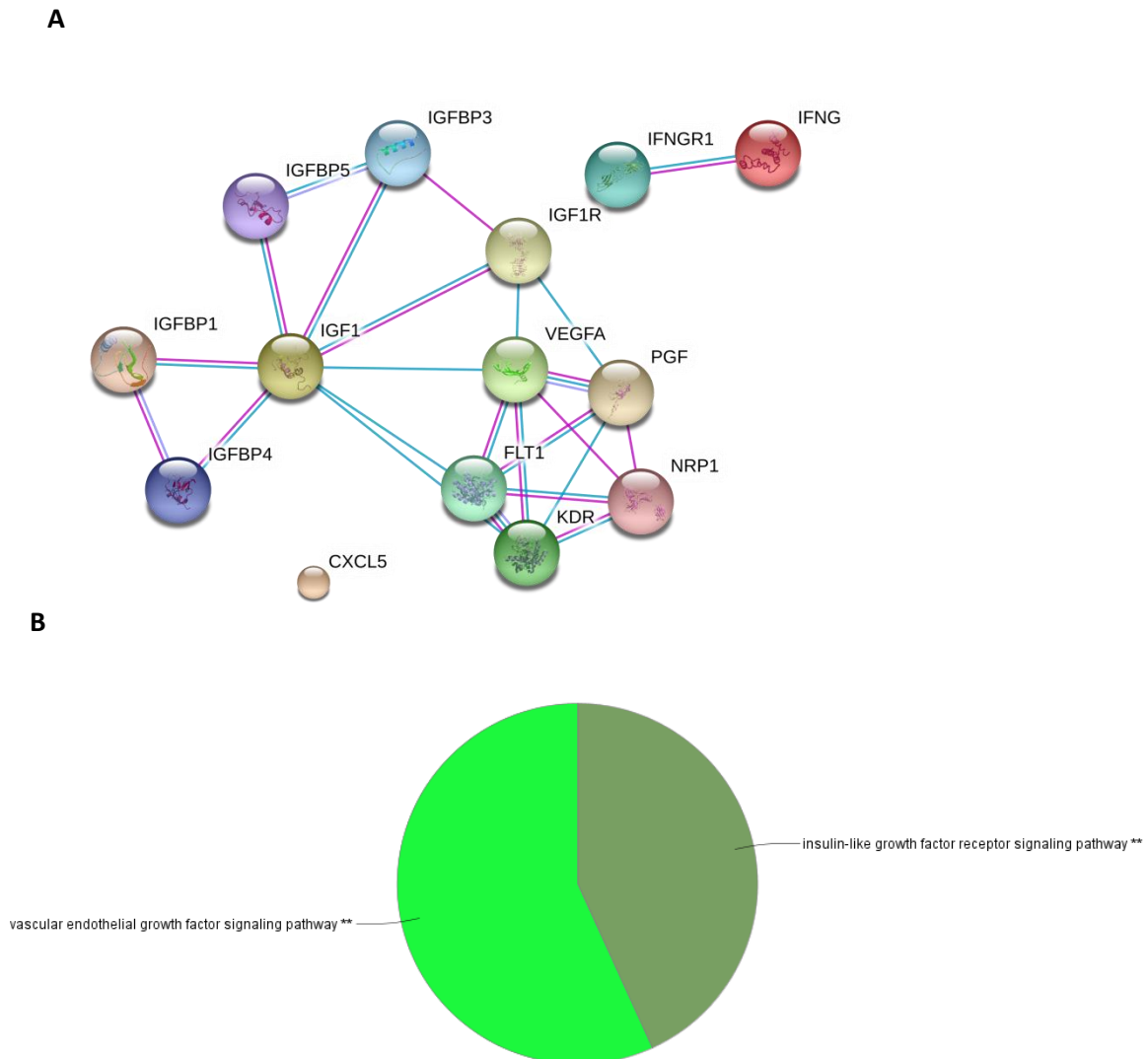
El pase celular también se asoció con modificaciones cuantitativas del secretoma neovascularizante de las hASC, e igualmente la concentración de algunas proteínas tuvo una respuesta similar en ambas muestras. Sin embargo, se evidenciaron cambios contrarios entre las dos muestras analizadas. La concentración de las proteínas EGF, PDGF-BB, Leptina, TGF- $\beta$ , TIMP-1, Angiopoyetina 1, IL-4, IL-1 $\alpha$ , IL-10, GM-CSF, G-CSF, CCL-

7, CCL-13, Tie-2 y CEGFR2 cambió de forma diferente en el secretoma de las dos muestras analizadas en respuesta al pase celular bajo condiciones estándar de producción.

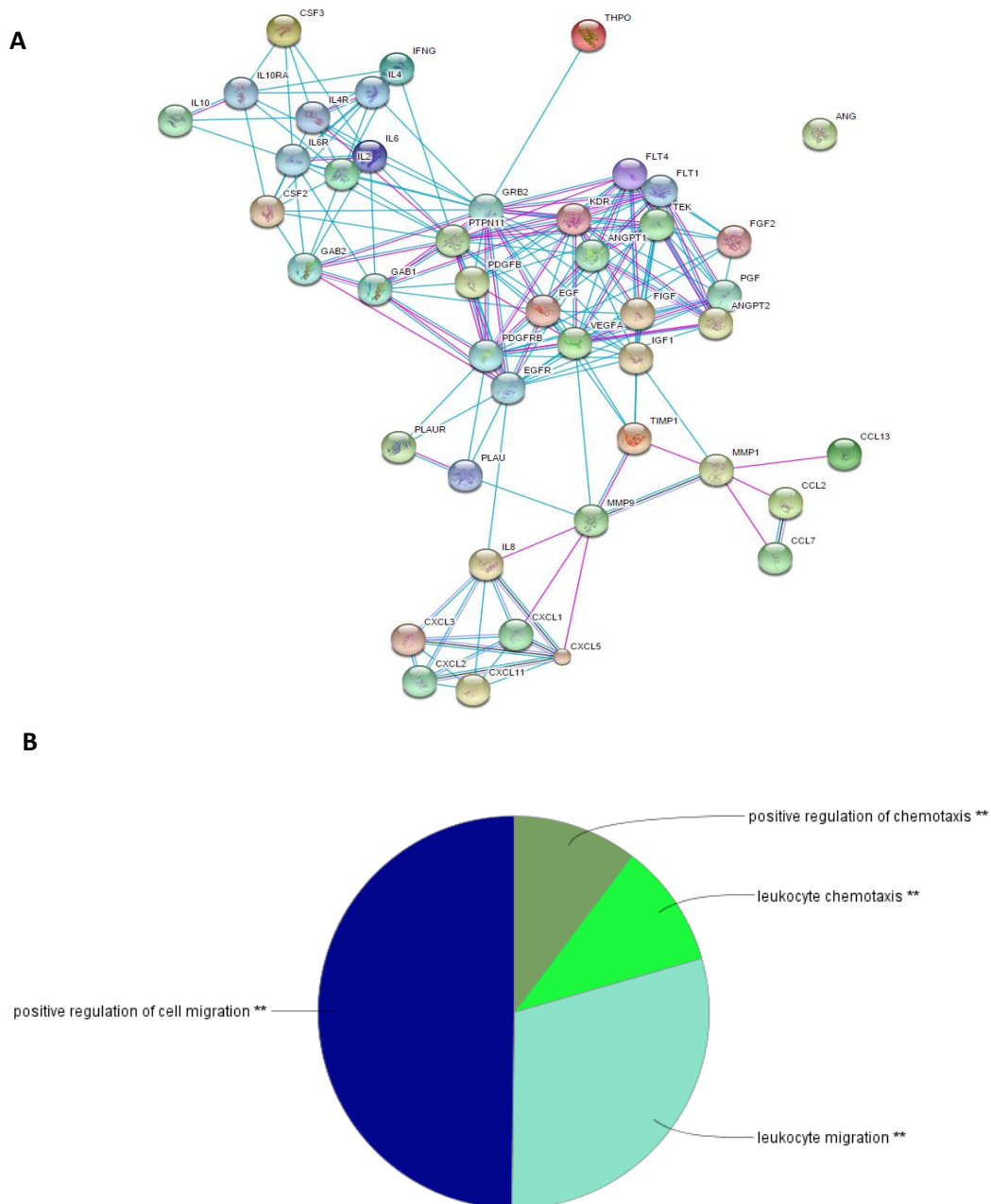


**Figura 4.19. Factores neovascularizantes que aumentaron su concentración relativa (por millón de células) en el MC de las hASC de séptimo pase en respuesta a la producción xeno-free.** Porcentaje de aumento de la concentración relativa en el MC de ambas muestras, en respuesta a la producción xeno-free de las hASC, frente a su concentración en el MC de las hASC producidas en condiciones estándar.

Por su parte, el pase celular tuvo un efecto diferente sobre el secretoma de las hASC producidas en condiciones xeno-free y las hASC producidas en condiciones estándar. El MC-Xf de las hASC de séptimo pase, tuvo mayor concentración de CXCL-5, THPO, VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3(Fig. 4.22A).



**Figura 4.20. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que aumentaron su concentración en el MC de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones xeno-free.** A. Reconstrucción estructural de la red de mutua asociación de las proteínas que aumentaron su concentración relativa en el secretoma de las hASC de séptimo pase, en respuesta a la producción xeno-free. Evidencia experimental (—) y de bases de datos (---). B. Enriquecimiento mediante anotación por GO en ClueGo, de las funciones moleculares y procesos celulares en los cuales participan las proteínas y las redes reconocidas en la reconstrucción estructural de la red.

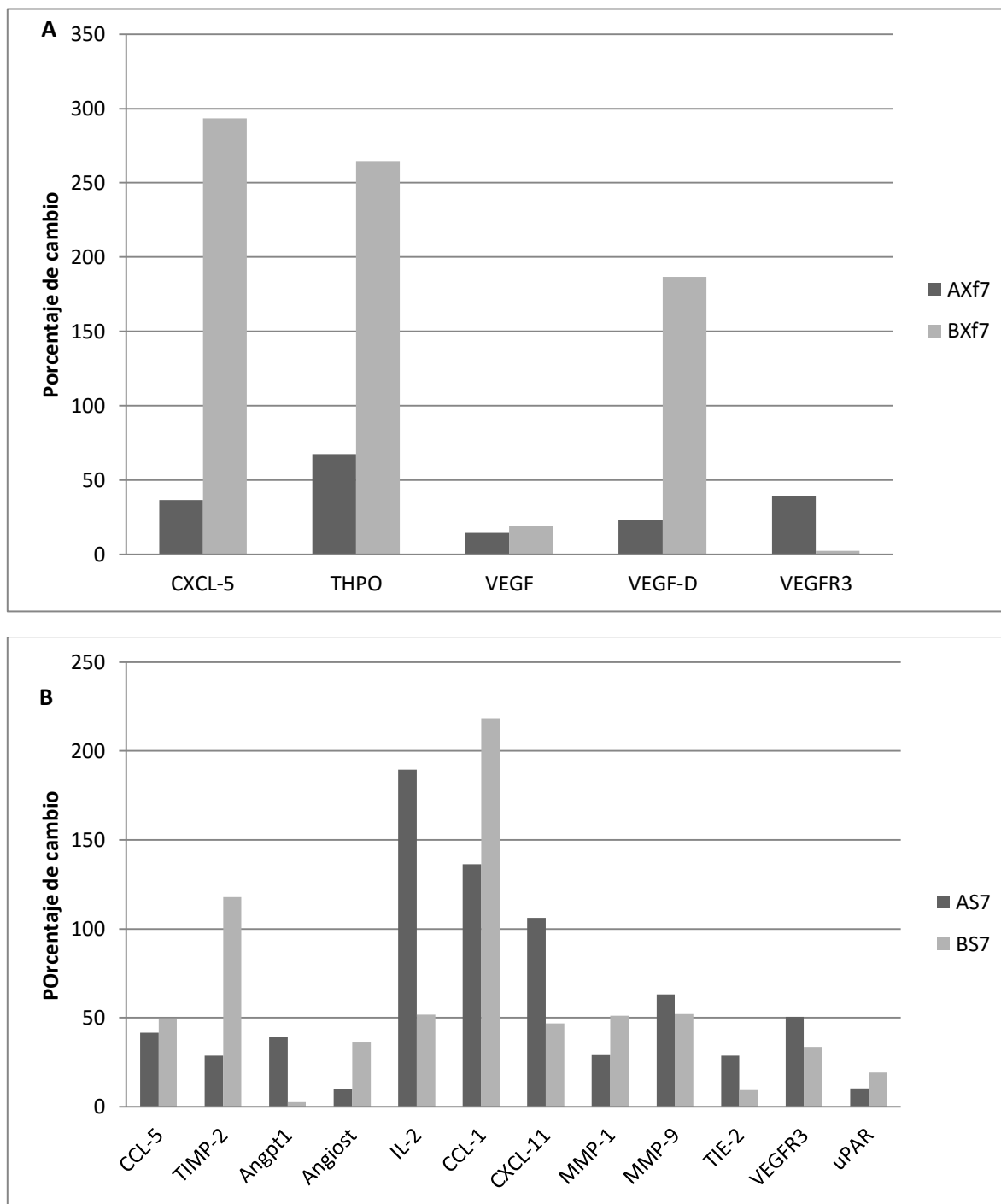


**Figura 4.21. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que disminuyeron su concentración en el MC de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones xeno-free.** A. Reconstrucción estructural de la red de mutua asociación de las proteínas que disminuyeron su concentración relativa en el secretoma de las hASC de séptimo pase, en respuesta a la producción xeno-free. Evidencia experimental (—) y de bases de datos (—). B. Enriquecimiento mediante anotación por GO en ClueGo, de las funciones moleculares y procesos celulares en los cuales participan las proteínas y las redes reconocidas en la reconstrucción estructural de la red.

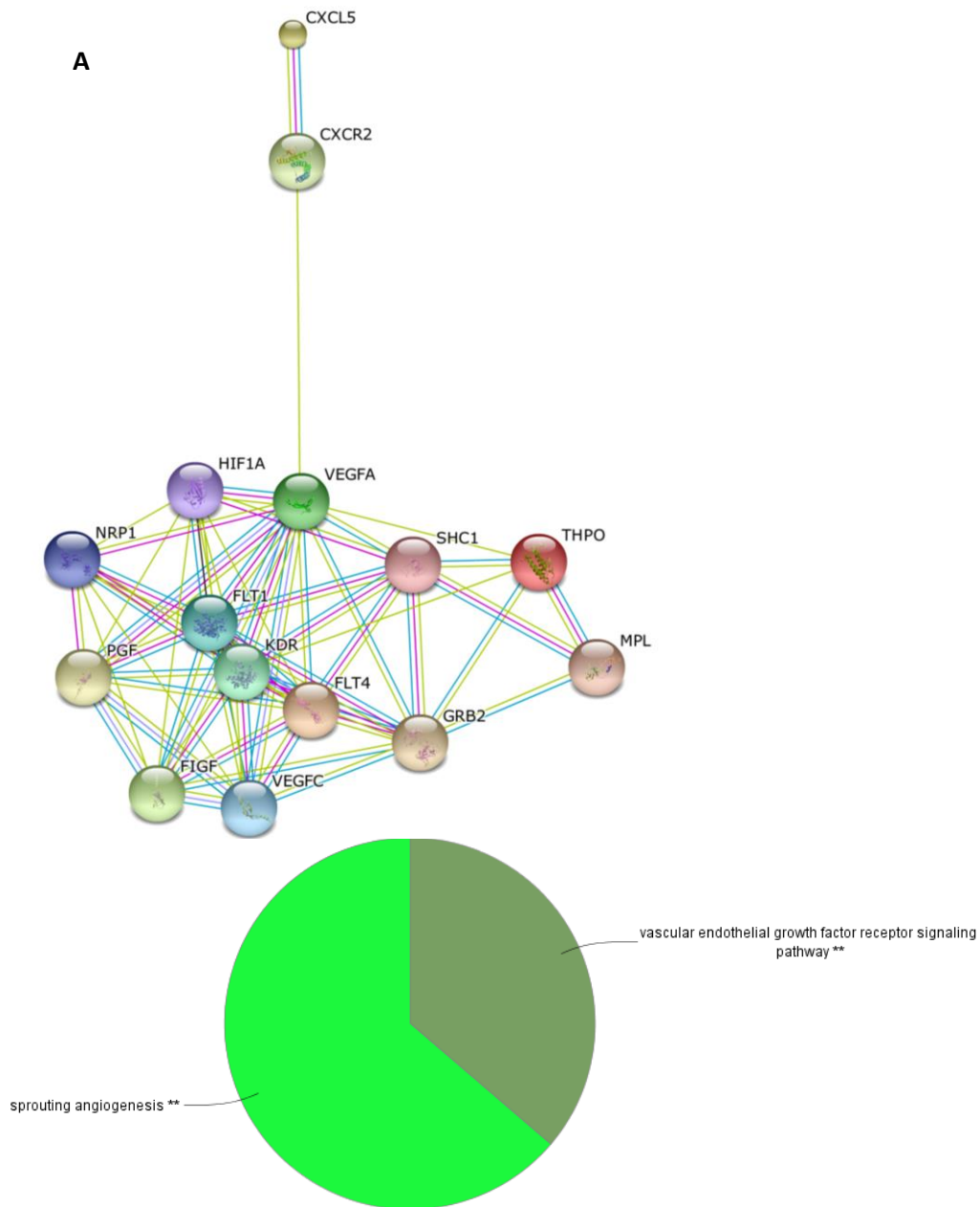
Al comparar el MC-FBS de hASC de séptimo pase con el MC-FBS de hASC de cuarto pase, se encontró mayor concentración de un grupo de proteínas que incluyen factores de efecto anti-neovascularizante como TIMP-2, Angiostatina (PLG), CXCL11, TIE-2 y la forma soluble del receptor 3 de VEGF, en el MC de hASC de séptimo pase; además de factores con capacidad pro-inflamatoria como CCL-5 y CCL-1 (Fig. 4.22B).

El análisis bioinformático de los cambios del secretoma neovascularizante de las hASC en respuesta al pase celular bajo condiciones xeno-free de producción celular, evidenció que estas células tendrían mayor actividad de la vía de señalización de VEGF (Fig. 4.23). Por su parte las células de séptimo pase producidas bajo condiciones estándar tendrían mayor actividad del receptor de IL-2, la vía de señalización mediada por quimioquinas, fibrinólisis, los procesos moleculares relacionados con la regulación de la migración de células epiteliales (Fig. 4.24); y menor actividad de la vía molecular de ERK-1 y 2, regulación de la quimiotaxis y la interacción de citoquinas con sus receptores (Fig. 4.25).

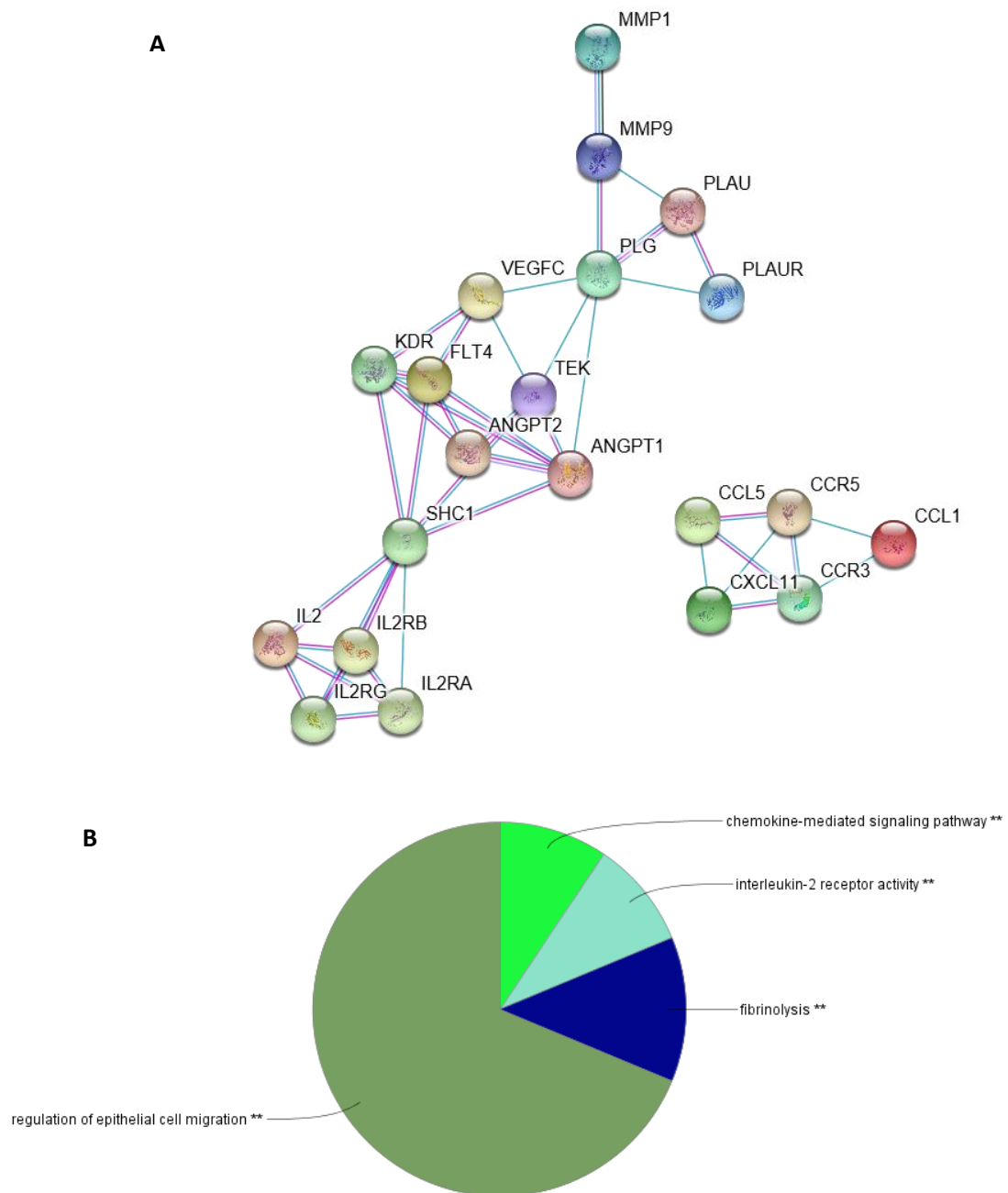




**Figura 4.22. Efecto del pase celular en el secretoma de las hASC.** Porcentaje de cambio en la concentración de algunos factores neovascularizantes en el medio condicionado por hASC de séptimo pase, comparándolo con su concentración en el MC por células de cuarto pase. Porcentaje de aumento asociado al pase en condiciones xeno-free de producción (A) y condiciones estándar de producción (B).

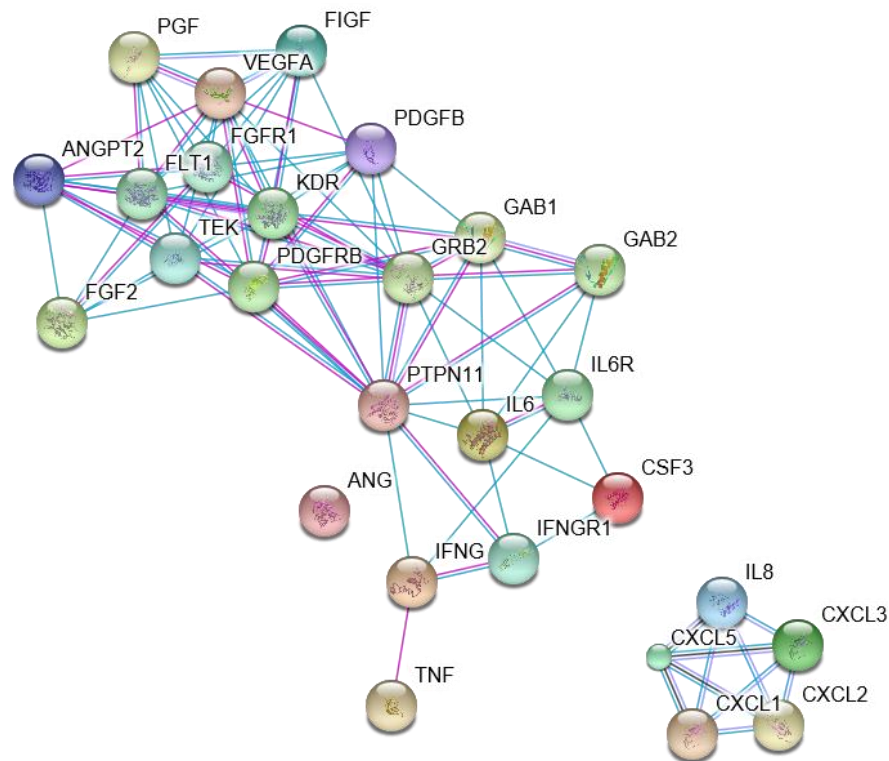


**Figura 4.23. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que aumentaron su concentración en el MC de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones xeno-free.** A. Reconstrucción estructural de la red de mutua asociación de las proteínas que aumentaron su concentración relativa en el secretoma de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar. Evidencia experimental (—) y de bases de datos (—). B. Enriquecimiento mediante anotación por GO en ClueGo, de las funciones moleculares y procesos celulares en los cuales participan las proteínas y las redes reconocidas en la reconstrucción estructural de la red.

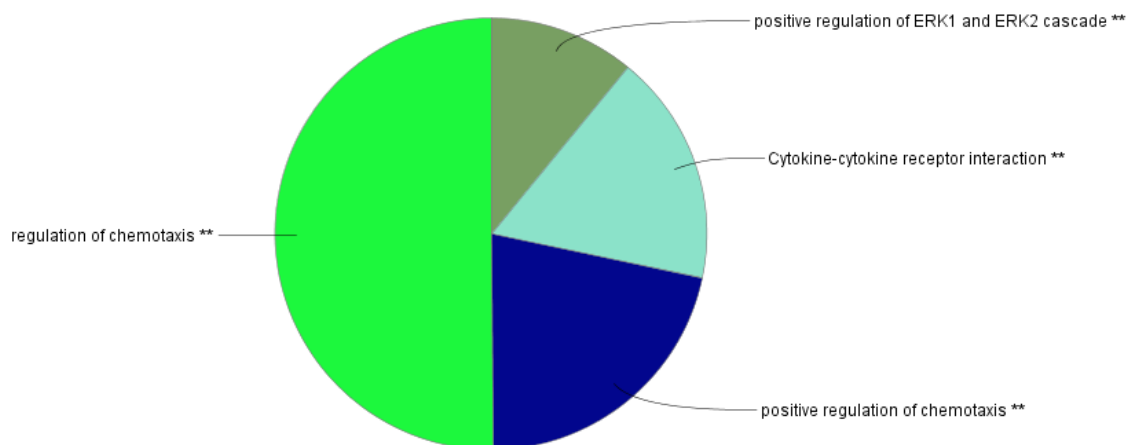


**Figura 4.24. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que aumentaron su concentración en el MC de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar.** A. Reconstrucción estructural de la red de mutua asociación de las proteínas que aumentaron su concentración relativa en el secretoma de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar. Evidencia experimental (—) y de bases de datos (—). B. Enriquecimiento mediante anotación por GO en ClueGo, de las funciones moleculares y procesos celulares en los cuales participan las proteínas y las redes reconocidas en la reconstrucción estructural de la red.

A



B



**Figura 4.25. Análisis bioinformático del grupo de factores neovascularizantes que redujeron su concentración en las hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar.** A. Reconstrucción estructural de la red de mutua asociación de las proteínas que aumentaron su concentración relativa en el secretoma de las hASC producidas en condiciones estándar, en respuesta al pase celular. Evidencia experimental (—) y de bases de datos (—) y de coexpresión (—). B. Enriquecimiento mediante anotación por GO en ClueGo, de las funciones moleculares y procesos celulares en los cuales participan las proteínas y las redes reconocidas en la reconstrucción estructural de la red.

En conclusión, la producción xeno-free se asoció con el aumento de la secreción de factores pro-neovascularizantes en ambas muestras y ambos pases, además de la disminución de la secreción de proteínas anti-neovascularizantes como los inhibidores de metaloproteinasas (TIMP-1 y TIMP-2) y las formas solubles de los receptores de angiopoyetinas (Tie-2) y VEGF (VEGFR2 y VEGFR3), además de las proteínas pro-neovascularizantes como CXCL1-3, MCP-4, las interleuquinas IL-2 e IL-6, los factores de crecimiento VEGF-D, TFG- $\beta$ 1, las angiopoyetinas 1 y 2, las metaloproteinasas MMP-1 y 9, y la molécula de anclaje PECAM-1.

Por su parte, el pase celular se asoció con la reducción en la secreción de todos los factores estudiados, mientras que bajo condiciones estándar de producción celular se asoció con el aumento de la secreción de factores de efecto anti-neovascularizante.

#### **4.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE DE LAS HASC**

##### **4.4.1. FORMACIÓN DE TUBOS DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN MATRIGEL (MODELO IN VITRO)**

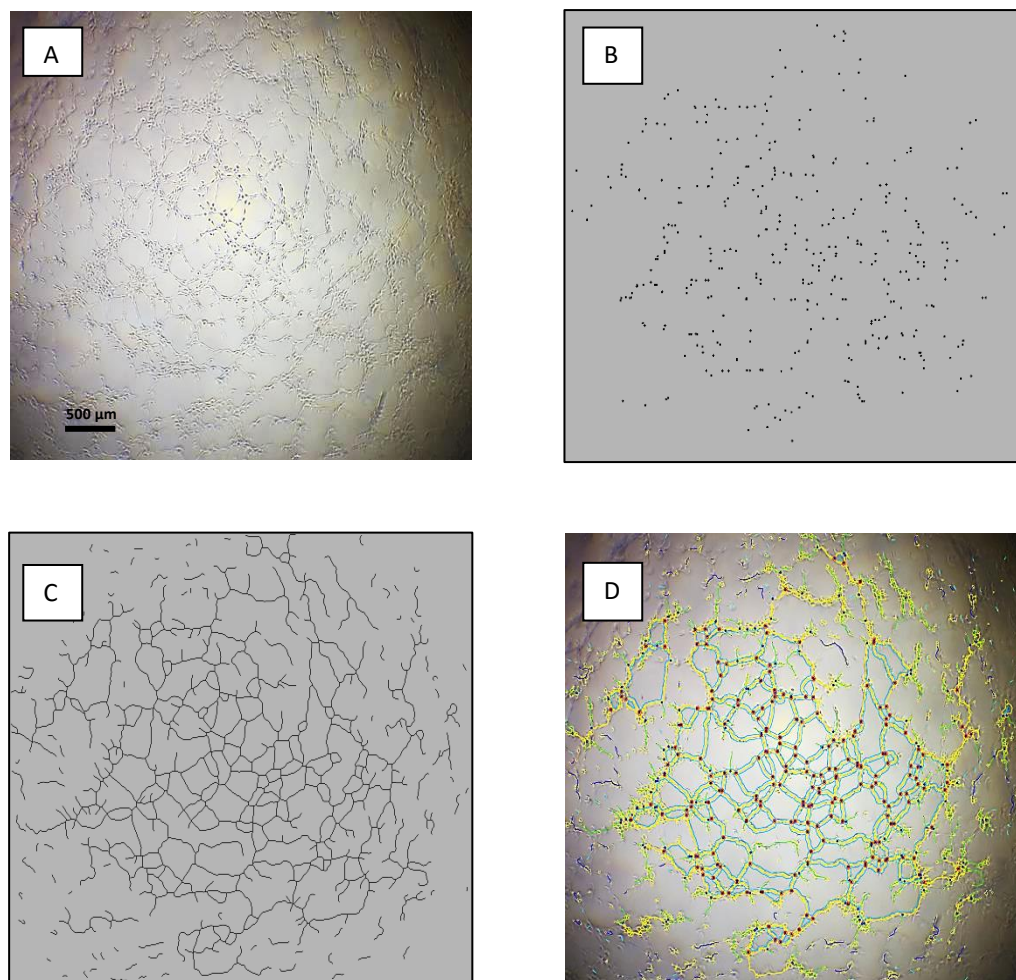
El ensayo de formación de redes con células endoteliales en matrigel es un modelo aceptado de angiogénesis, toda vez que brinda una idea respecto a la inducción de proliferación, migración y reorganización de células endoteliales. Las redes formadas en este ensayo, se evalúan en función de las bifurcaciones, conexiones y longitud de los

tramos formados por ellas, lo cual sugiere la capacidad de inducir la formación de una red capilar por parte de los tratamientos evaluados, en este caso CM-Ss y CM-Xfs.

La estandarización de esta técnica experimental consistió en el seguimiento fotográfico de las redes formadas por las células EA.hY926 (línea comercial de célula endotelial, ATCC<sup>®</sup> CRL-2922) sembradas sobre el matrigel y cultivadas en OptiMEM suplementado con VEGF (control positivo) u OptiMEM no suplementado (control negativo). Esto se hizo por diferentes espacios de tiempo para definir el momento adecuado para la evaluación de los resultados.

Después de seis horas de cultivo, pudieron evidenciarse claramente las redes formadas por las células EA.hY926 cultivadas en medio suplementado con VEGF, mientras que las cultivadas en medio no suplementado no las estructuraron. Sin embargo, después de 12 horas de cultivo fueron evidentes las redes formadas en todas las condiciones experimentales, incluyendo aquellas del control negativo (medio de cultivo no suplementado). Con estos resultados se decidió hacer la cuantificación a las seis horas de cultivo en las diferentes condiciones experimentales y los respectivos controles.

En la figura 4.26 se presenta la progresión de imágenes generadas con la herramienta *Angiogenesis Analyzer* de ImageJ (Carpenter, 2012). Puede notarse como partiendo de la imagen A en donde se observa la red formada por las células endoteliales, se identifican los nodos en la figura B (puntos) y se reconstruye la red (Fig. 4.26D) después de identificar los diferentes componentes (Figs. 3.3 y 4.26C).



**Figura 4.26. Progresión de las imágenes obtenidas en la caracterización de los resultados del ensayo de formación de tubos en matrigel.** Partiendo de la imagen A, la herramienta identifica automáticamente los nodos (B) y los diferentes aspectos propios de la estructura a caracterizar, para obtener una reproducción de la red (C), y lograr la diagramación de los nodos (puntos en D), segmentos maestros (segmentos demarcados con tres líneas en D).

Con el programa Image J se obtuvo una reproducción de la red formada en cada una de las condiciones experimentales (Fig. 4.27). A partir de estas modelaciones, se caracterizó cuantitativamente la red (número de nodos, uniones, segmentos, uniones maestras, segmentos maestros y redes), con lo cual se hizo análisis cuantitativo del resultado de cada tratamiento en este modelo experimental.

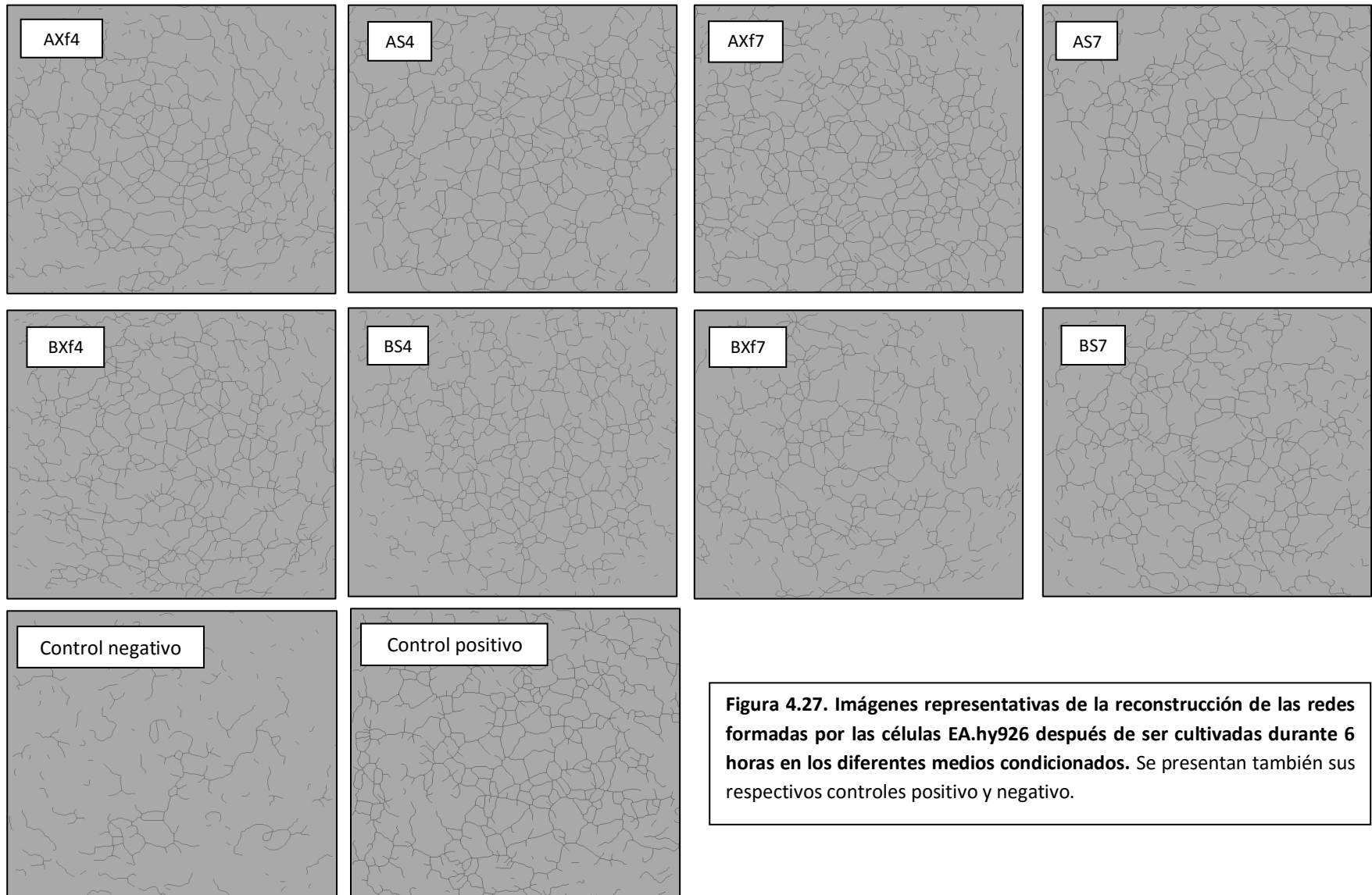
Con los MC de las hASC de las dos muestras estudiadas (A y B), la producción xeno-free y el pase celular se asociaron con diferencias significativas en las variables analizadas en las redes formadas en el ensayo de matrigel (Figs. 4.28 – 4.38).

El ANOVA demostró diferencias significativas entre los grupos, respecto a la cantidad de nodos ( $F(9,20)=53.81$ ,  $p=0.000$ ), uniones ( $F(9,20)=58.55$ ,  $p=0.000$ ), uniones maestras ( $F(9,20)=55.94$ ,  $p=0.000$ ), segmentos maestros ( $F(9,20)=22.31$ ,  $p=0.000$ ) y redes ( $F(9,20)=30.36$ ,  $p=0.000$ ), formadas por las células EA.hy926 cultivadas en los diferentes MCs evaluados.

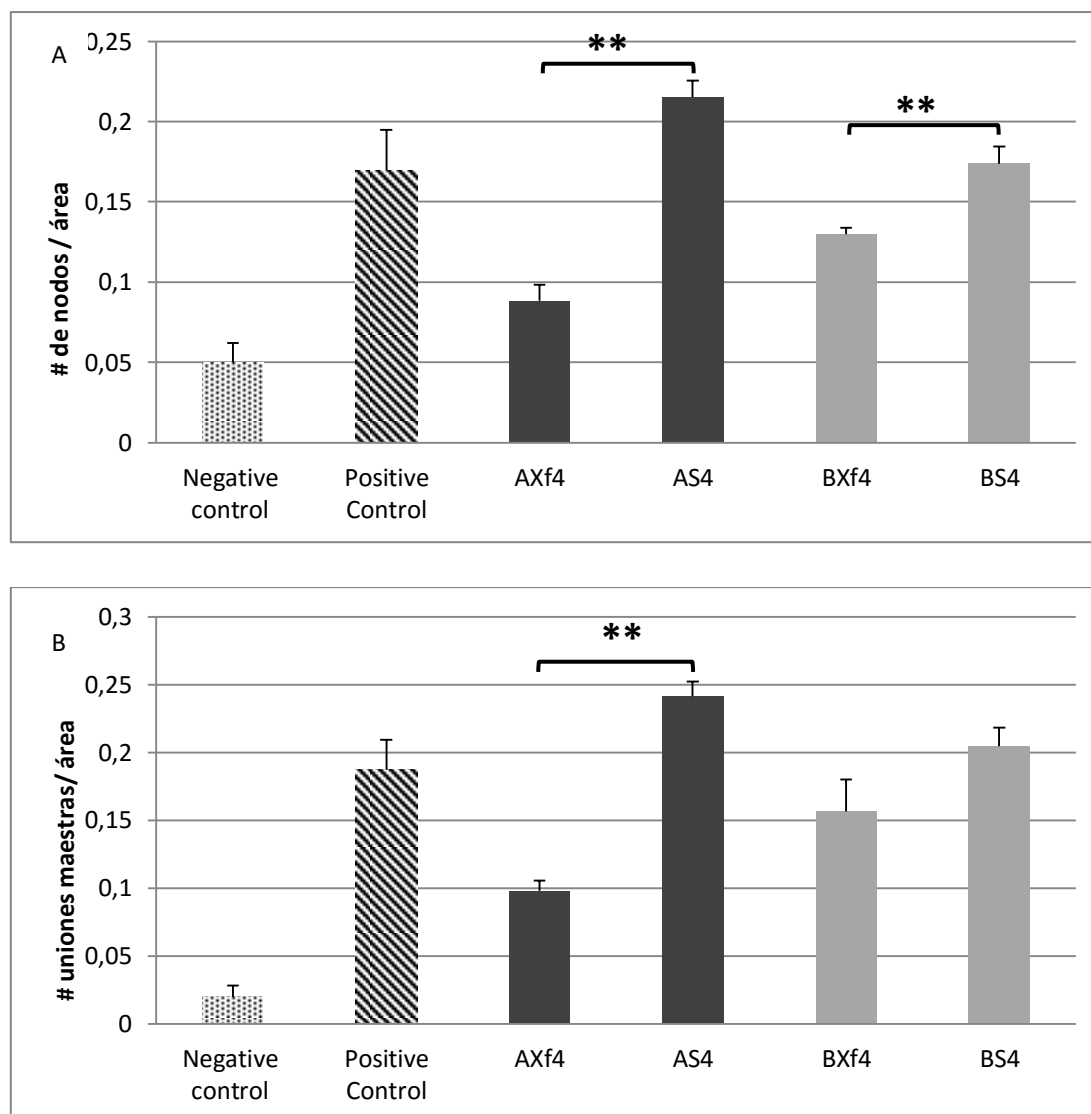
La comparación entre grupos experimentales (Test *Post-hoc* de Bonferroni) evidenció la disminución significativa en la cantidad de nodos ( $p$  muestra A= 0.006;  $p$  muestra B= 0.01) y uniones maestras ( $p$  muestra A= 0.09;  $p$  muestra B= 0.00423) formadas por las células cultivadas en MC-Xf de hASC de cuarto pase, frente las cultivadas en MC-S de hASC de cuarto pase (Fig. 4.28 y Tab. 4.5).



## Resultados



**Figura 4.27.** Imágenes representativas de la reconstrucción de las redes formadas por las células EA.hy926 después de ser cultivadas durante 6 horas en los diferentes medios condicionados. Se presentan también sus respectivos controles positivo y negativo.



**Figura 4.28. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de nodos (A) y uniones maestras (B), por parte de las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de cuarto pase. MC-Xf de hASC producidas en condiciones xeno-free (AXf4 y BXf4) o MC-S de hASC producidas en condiciones estándar (AS4 y BS4). \*\* $p \leq 0.01$ .**

**Tabla 4.5. Análisis estadístico (valor de p) de la disminución de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC xeno-free de cuarto pase**

Muestra	A	B
Nodos	0.006	0.01
Uniones maestras	0.09	0.004

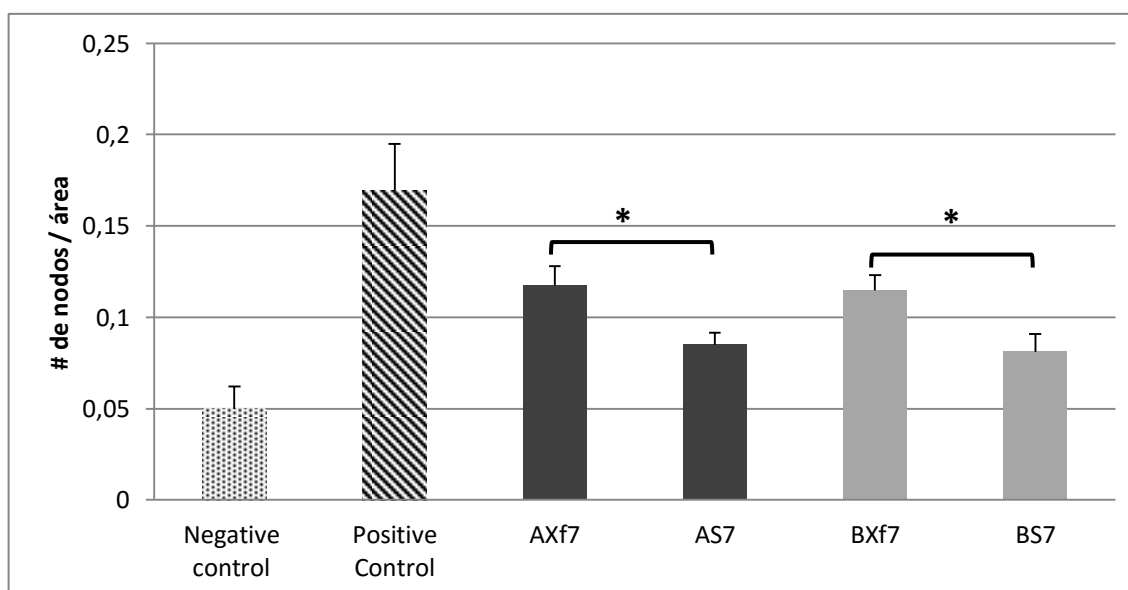
**Significancia estadística de la disminución de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC xeno-free de cuarto pase.** Se presenta el valor de p, obtenido mediante test post hoc de Bonferroni de las comparaciones entre los MC-Xf y MC-S de cuarto pase, para la formación de nodos y uniones maestras por parte de las células EA.hy926.

La producción xeno-free también modificó la capacidad funcional del secretoma neovascularizante de las hASC cultivadas hasta séptimo pase (Tab. 4.6). En ambas muestras se encontró aumento significativo de la cantidad de nodos (Fig. 4.29, p de la muestra A=0.018; p de la muestra B=0.011), uniones (Fig. 4.30, p de la muestra A= 0.007; p de la muestra B = 0.011), uniones maestras (Fig. 4.30, p de la muestra A= 0.012; p de la muestra B= 0.000) y segmentos maestros (Fig. 4.32, p de la muestra A= 0.034; p de la muestra B= 0.007), en respuesta a los tratamientos con MC-Xf de hASC de séptimo pase respecto a las redes formadas por las células EA.hy926 cultivadas en MC-S de séptimo pase.

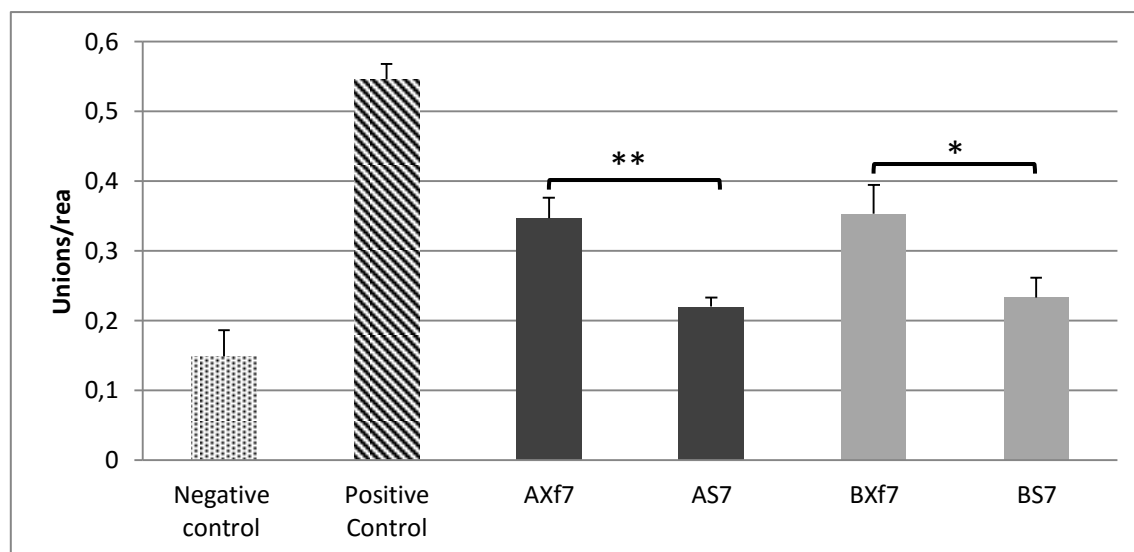
**Tabla 4.6. Análisis estadístico (valor de p), del aumento de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC xeno-free de séptimo pase**

Muestra	A	B
Nodos	0.018	0.011
Uniones	0.007	0.011
Uniones maestras	0.012	0.000
Segmentos maestros	0.034	0.007

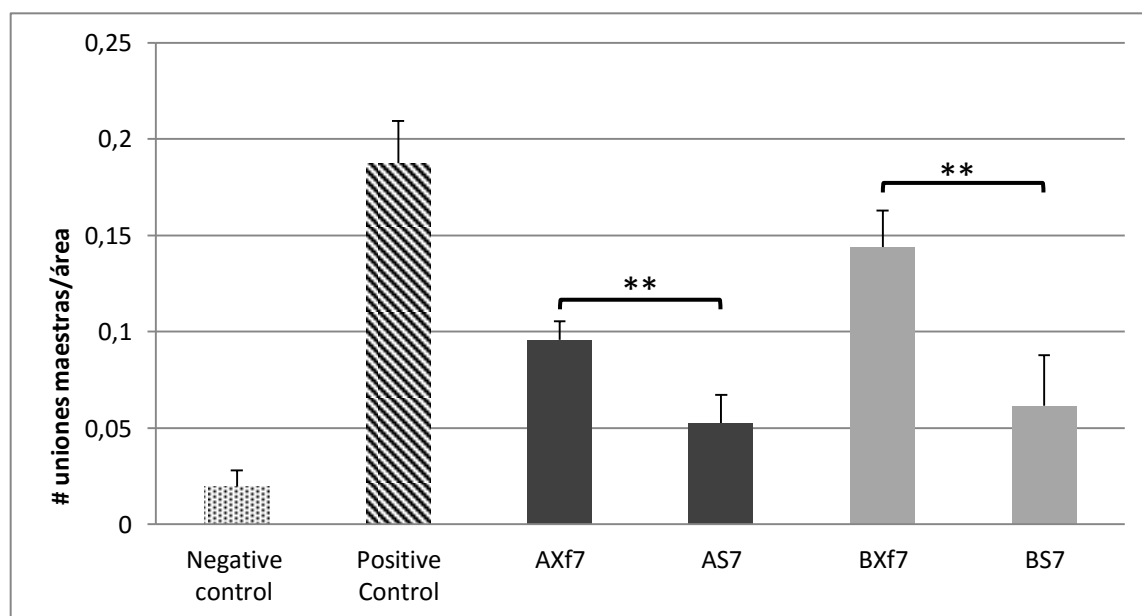
**Significancia estadística de la disminución de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC xeno-free de séptimo pase.** Se presenta el valor de p, obtenido mediante test post hoc de Bonferroni de las comparaciones entre los MC-Xf y MC-S de séptimo pase, para la formación de nodos, uniones, uniones maestras y segmentos maestros por parte de las células EA.hy926.



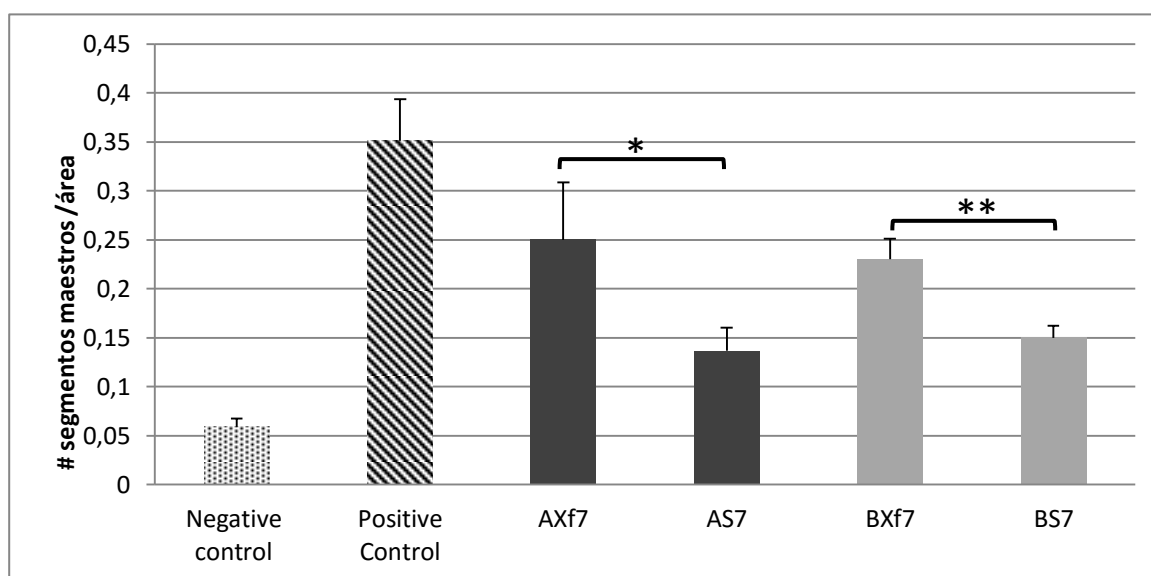
**Figura 4.29. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de nodos por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de séptimo pase.** MC de hASC producidas en condiciones xeno-free, (AXf7 y BXf7) o MC de hASC producidas en condiciones estándar, MC-FBS (AS7 y BS7). \* $p \leq 0.05$ .



**Figura 4.30. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de uniones por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de séptimo pase.** MC de hASC producidas en condiciones xeno-free (AXf7 y BXf7) o MC de hASC producidas en condiciones estándar (AS7 y BS7). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .



**Figura 4.31. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de uniones maestras por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de séptimo pase.** MC de hASC producidas en condiciones xeno-free (AXf7 y BXf7) o MC de hASC producidas en condiciones estándar (AS7 y BS7). \* $p \leq 0.05$ .



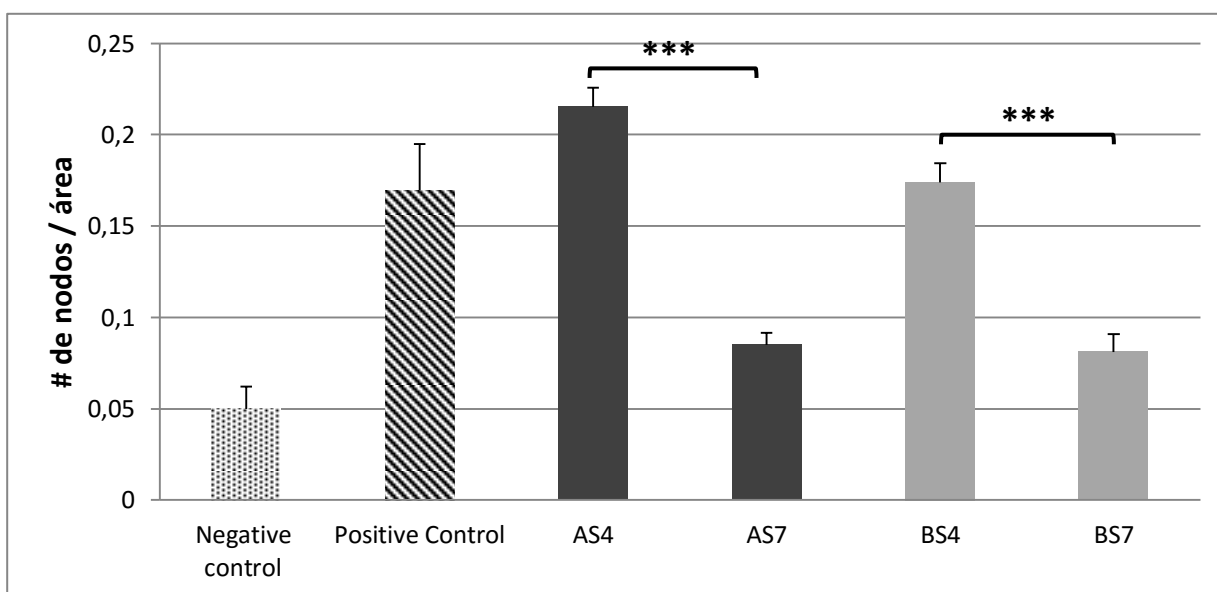
**Figura 4.32. Efecto de la producción xeno-free sobre la formación de segmentos maestros por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC de séptimo pase.** MC de hASC producidas en condiciones xeno-free (AXf7 y BXf7) o MC de hASC producidas en condiciones estándar (AS7 y BS7). \* $p \leq 0.05$ .

Por su parte, el pase celular se asoció con la reducción significativa de la capacidad funcional de los MC-FBS en este ensayo (Tab. 4.7). En las figuras 4.33 a 4.36 se muestra que comparándolos con los MC-FBS de hASC de cuarto pase, los MC-FBS de hASC de séptimo pase, indujeron la formación de una cantidad significativamente menor de nodos ( $p$  de la muestra A= 0.00094;  $p$  de la muestra B= 0.000), uniones ( $p$  de la muestra A= 0.000;  $p$  de la muestra B= 0.007) y uniones maestras ( $p$  de la muestra A= 0.0003;  $p$  de la muestra B= 0.000). Además, de que con una muestra B se documentó también la formación de una significativa menor cantidad de segmentos maestros ( $p=0.000$ ) y redes ( $p=0.002$ ). Figura 4.36

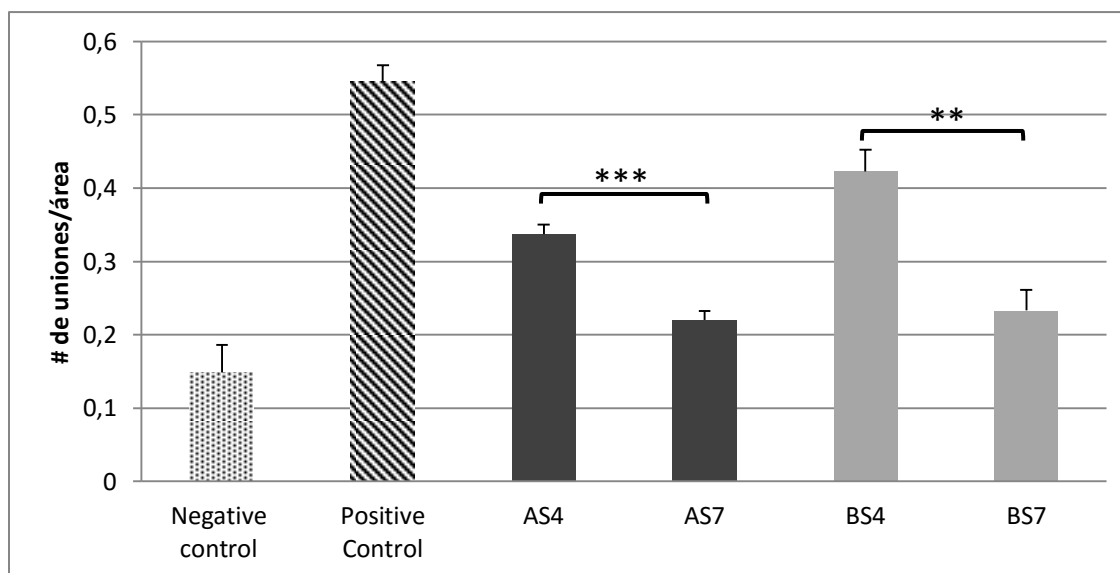
**Tabla 4.7. Análisis estadístico (valor de p) de la disminución de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar**

Muestra	A	B
Nodos	0.0009	0.000
Uniones	0.000	0.007
Uniones maestras	0.0003	0.000
Segmentos maestros	0.5	0.000
Redes	0.3	0.002

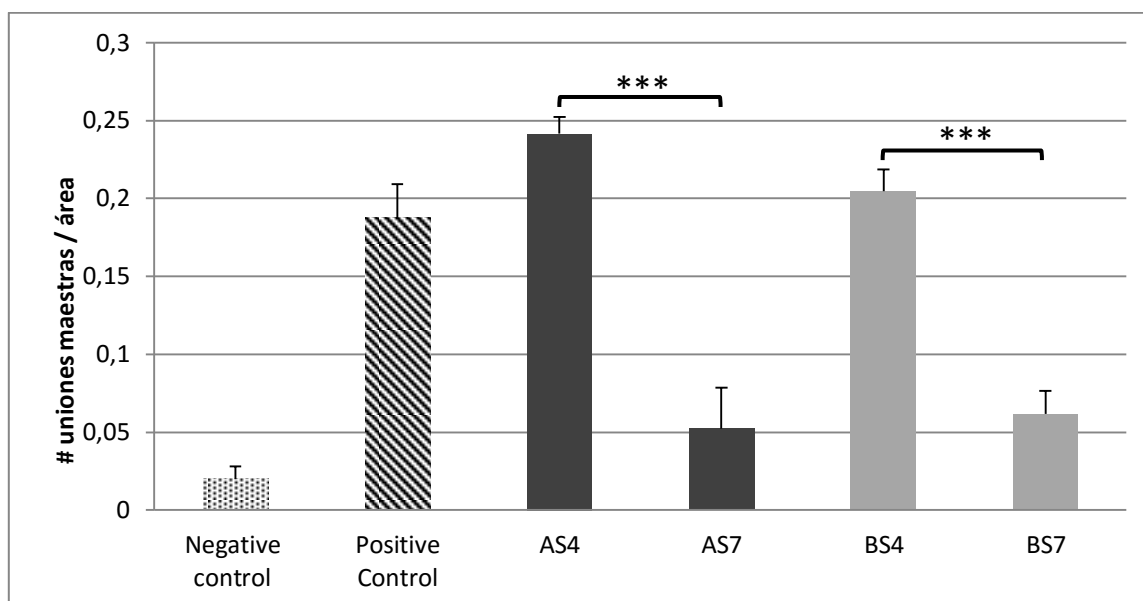
**Significancia estadística de la disminución de la capacidad funcional en el ensayo de matrigel, de los MC de hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar.** Se presenta el valor de p, obtenido mediante test post hoc de Bonferroni de las comparaciones entre los MC-S de cuarto y séptimo pase, para la formación de nodos, uniones, uniones maestras, segmentos maestros y redes por parte de las células EA.hy926.



**Figura 4.33. Efecto del pase sobre la formación de nodos por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones estándar. MC-FBS de hASC cultivadas hasta cuarto y séptimo pase. \*\*\* $p \leq 0.001$ .**

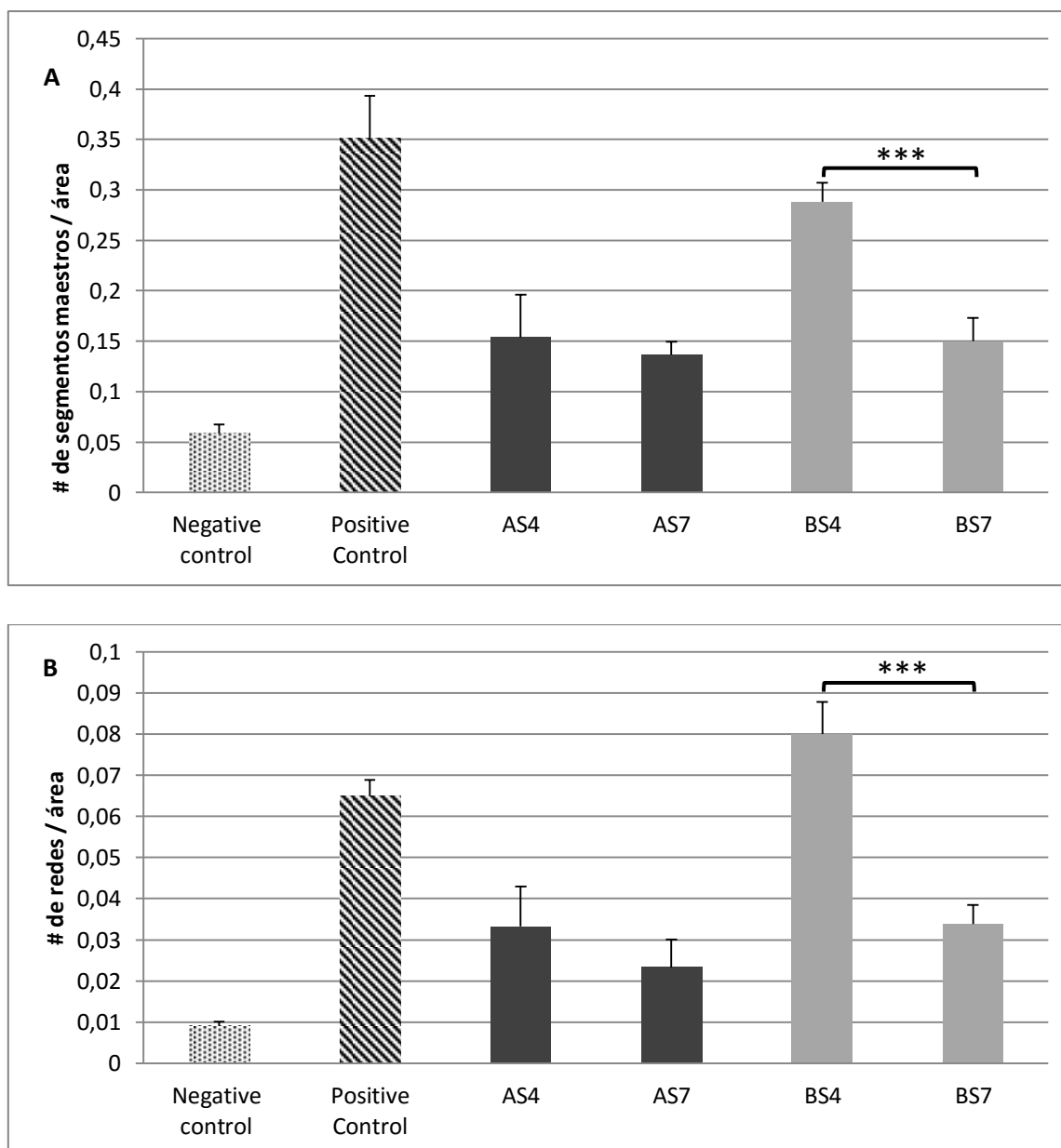


**Figura 4.34.** Efecto del pase sobre la formación de uniones por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones estándar. MC-FBS de hASC cultivadas hasta cuarto y séptimo pase. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

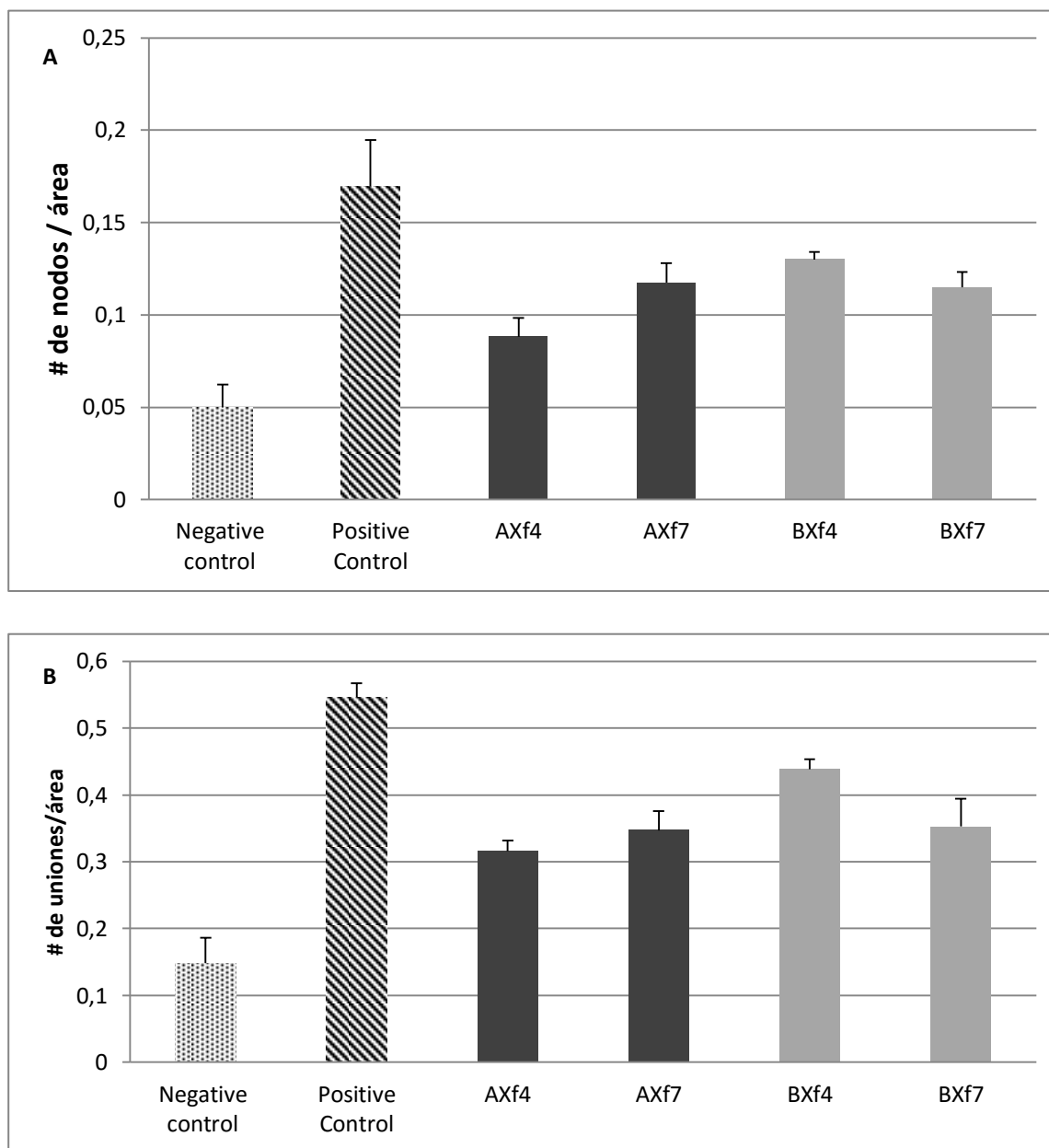


**Figura 4.35.** Efecto del pase sobre la formación de uniones maestras por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones estándar. MC-FBS de hASC cultivadas hasta cuarto y séptimo pase. \*\*\* $p \leq 0.001$ .

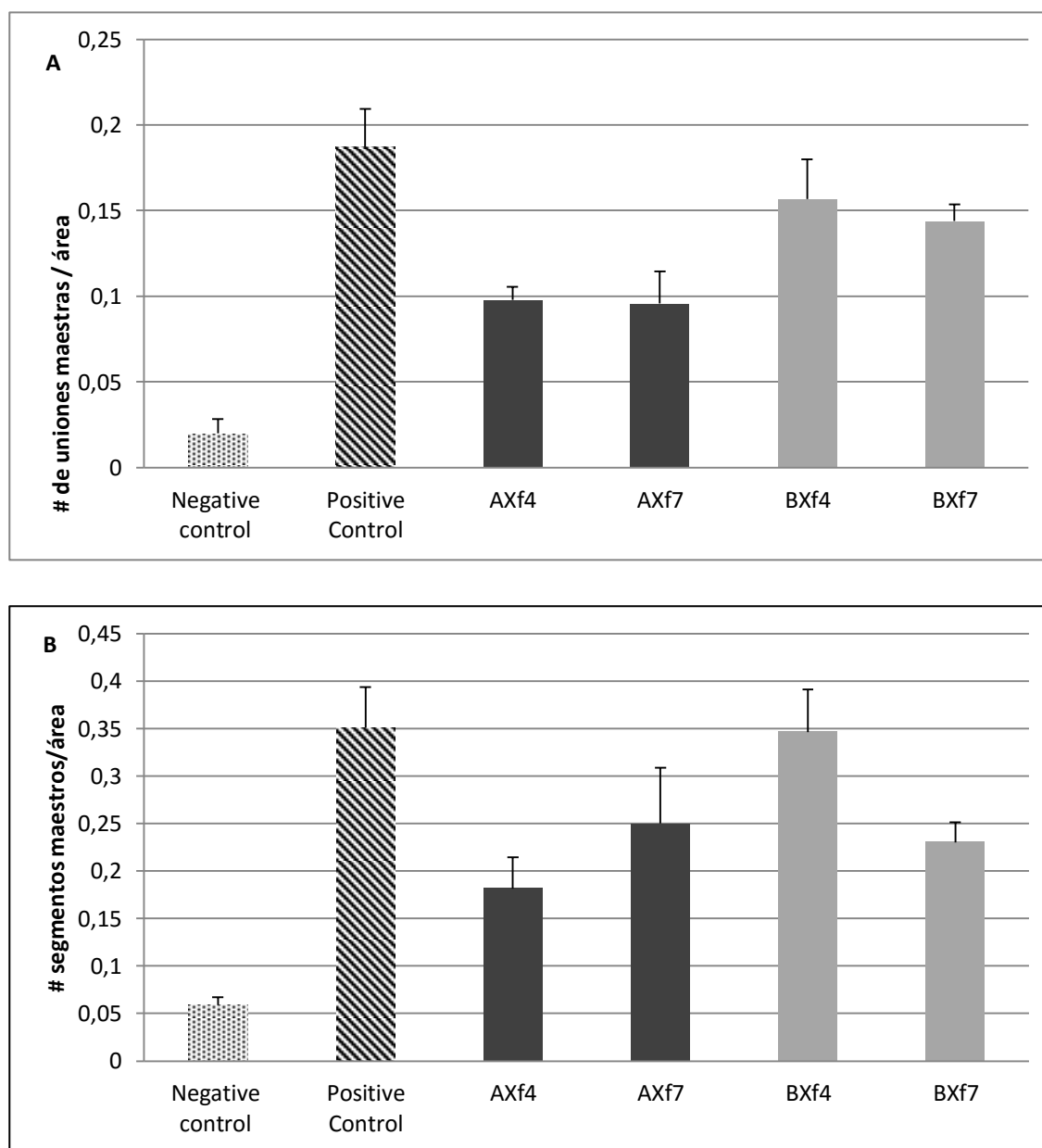




**Figura 4.36. Efecto del pase sobre la formación de segmentos maestros (A) y redes (B) por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones estándar. MC-FBS de hASC cultivadas hasta cuarto y séptimo pase. \*\*\* $p \leq 0.001$ .**



**Figura 4.37.** Efecto del pase sobre la formación de nodos (A) y uniones (B) por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free. MC-FBS de hASC cultivadas hasta cuarto y séptimo pase.

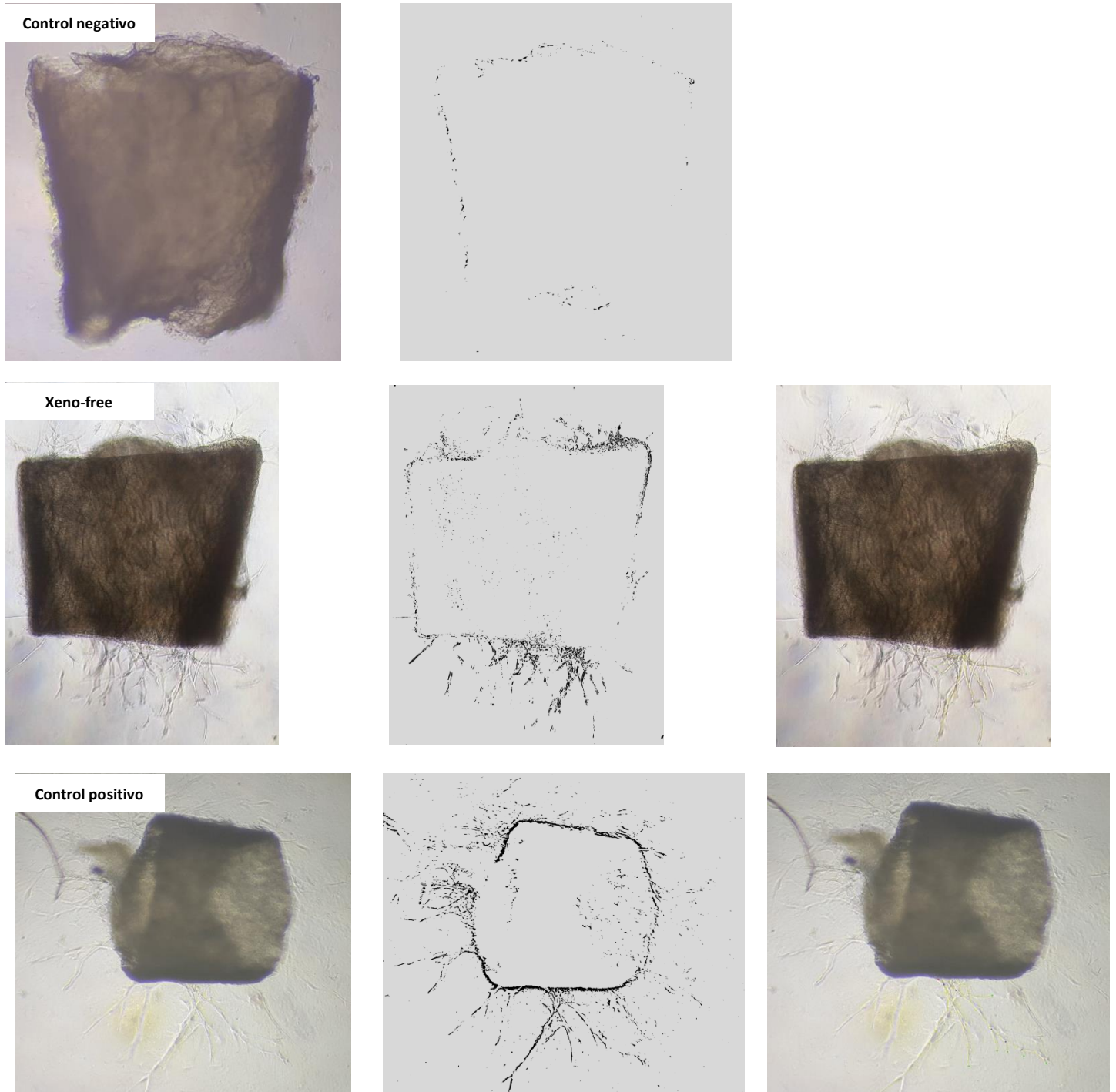


**Figura 4.38.** Efecto del pase sobre la formación de uniones maestras (A) y segmentos maestros (B) por las células EA.hy926 cultivadas en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free. MC-FBS de hASC cultivadas hasta cuarto y séptimo pase.

Bajo condiciones xeno-free de producción celular, el pase celular no tuvo asociación con cambios significativos en ninguna de las variables funcionales evaluadas con este modelo experimental (Figs. 4.37 y 4.38).

Puede concluirse entonces, que en este modelo experimental se documentaron cambios funcionales en el secretoma angiogénico de las hASC en respuesta a la producción xeno-free y al pase celular. La producción xeno-free se asoció con la reducción de la capacidad proangiogénica del secretoma de las hASC de cuarto pase, mientras que mejoró la capacidad funcional del secretoma de las hASC de séptimo pase. Por su parte, el pase celular se asoció con la reducción de la capacidad funcional del secretoma de las hASC producidas bajo condiciones estándar, aunque no se encontraron cambios de la capacidad funcional del secretoma angiogénico en respuesta al pase celular de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free.

4.4.2. ANILLOS DE AORTA (MODELO EX VIVO):



**Figura 4.39. Ejemplos representativos de los explantes de aorta murina cultivados durante 11 días en los diferentes Mcs.** La columna izquierda corresponde a imágenes de los explantes de anillos de aorta murina después ser incubados en los MCs. La columna de la mitad (imagen en blanco y negro) corresponde a la reconstrucción lograda con la herramienta *Angiogenesis Analyzer* de ImageJ, para la cuantificación del área cubierta por brotes angiogénicos. La columna de la derecha corresponde a la caracterización de un brote angiogénico, imagen a partir de la cual se cuantificó la longitud de los brotes y la cantidad de ramas emitidas por cada uno. La primera fila corresponde a un anillo de aorta cultivado en medio no suplementado (control negativo). La segunda corresponde a un anillo de aorta cultivado en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free, donde se evidencia brotes angiogénicos emergentes (flecha) y la última fila corresponde a un anillo cultivado en medio suplementado con VEGF (control positivo).

El ensayo de anillos de aorta es aceptado como un modelo válido de angiogénesis que además aporta información complementaria a la obtenida con el ensayo celular sobre matrigel. Este modelo experimental, al igual que el de matrigel, nos permitió evaluar la capacidad de los MCs de inducir la migración y reorganización de las células endoteliales, pero además permitió documentar la formación de capilares por parte de las células endoteliales, lo cual sugiere la capacidad de formar vasos sanguíneos completamente estructurados. Este resultado es importante, teniendo en cuenta que este modelo experimental cuenta con la presencia de células de músculo liso, componente importante de arteriolas, arterias y venas; que además tiene un rol fundamental en el desarrollo de la arteriogénesis.

En la figura 4.39 se presenta un ejemplo representativo de los resultados del ensayo de angiogénesis en anillos de aorta murina, utilizando la herramienta *Angiogenesis Analyzer*

de ImageJ para caracterizar la cantidad de capilares surgidos a partir de un explante de aorta, además de la longitud y cantidad de ramas de uno de esos capilares.

La fila izquierda de la figura 4.39 corresponde a imágenes de microscopía de contraste de fases de los explantes incubados durante 11 días en los diferentes MCs. La fila del centro corresponde a imágenes generadas con la herramienta *Angiogenesis Analyzer* para cuantificar el área cubierta por todos los brotes angiogénicos de cada explante, mientras que la fila de la derecha corresponde a imágenes obtenidas tras la reconstrucción gráfica de un brote angiogénico (longitud y cantidad de ramas).

El ANOVA de los resultados de este experimento también demostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales, respecto al área cubierta por brotes angiogénicos ( $F(9,20)=15.34$ ,  $p=0.000$ ), la longitud del brote angiogénico analizado ( $F(9,20)=14.82$ ,  $p=0.000$ ) y cantidad de ramas del brote ( $F(9,20)=15.21$ ,  $p=0.000$ ).

Tanto en cuarto como en séptimo pase, la producción xeno-free se correlacionó en ambas muestras con el aumento significativo (Tab. 4.8) de la cantidad de brotes angiogénicos generados a partir de los explantes de aorta murina. En las figuras 4.40 y 4.41 se presenta la comparación de los resultados obtenidos con los explantes de aorta cultivados en los MC-Xf frente a los MC-S, donde se observa el aumento significativo de la cantidad de brotes angiogénicos en respuesta a la producción xeno-free (p de la muestra A en cuarto pase: 0.029; p de la muestra B en cuarto pase: 0.022; p de la muestra A en séptimo pase: 0.028; p de la muestra B en séptimo pase: 0.055).

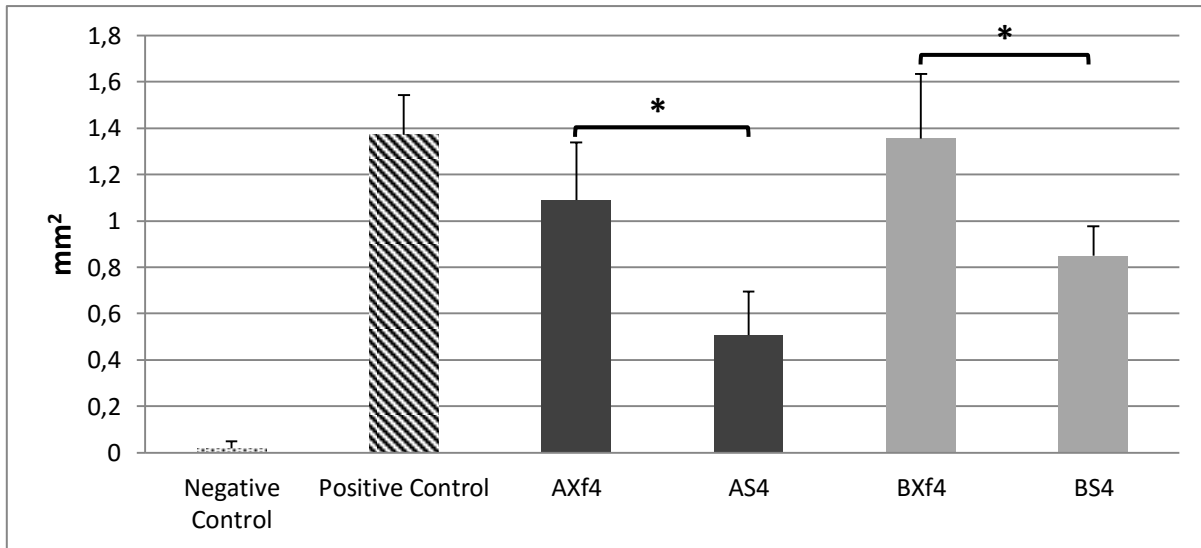
Por su parte, el pase celular careció de efecto sobre la cantidad de brotes angiogénicos en cualquiera de las dos condiciones de producción celular. En la figura 4.42 se presenta la comparación del área cubierta por brotes angiogénicos a partir de explantes cultivados en MC de hASC de cuarto y séptimo pase producidas en condiciones estándar (4.42A) y condiciones xeno-free (4.42B). El análisis individual de los brotes angiogénicos, evidenció que el MC-Xf de hASC de séptimo pase de la muestra B, indujo la formación de brotes angiogénicos significativamente más largos y con mayor cantidad de ramas que el MC-S de hASC de séptimo pase. Aunque la diferencia no fue significativa en los experimentos con los MC con la muestra A, si se observó la misma tendencia de lo observado con la muestra B (Tab. 4.8).

**Tabla 4.8. Análisis estadístico (valor de p) del aumento de la cantidad de brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC de hASC producidas en condiciones xeno-free.**

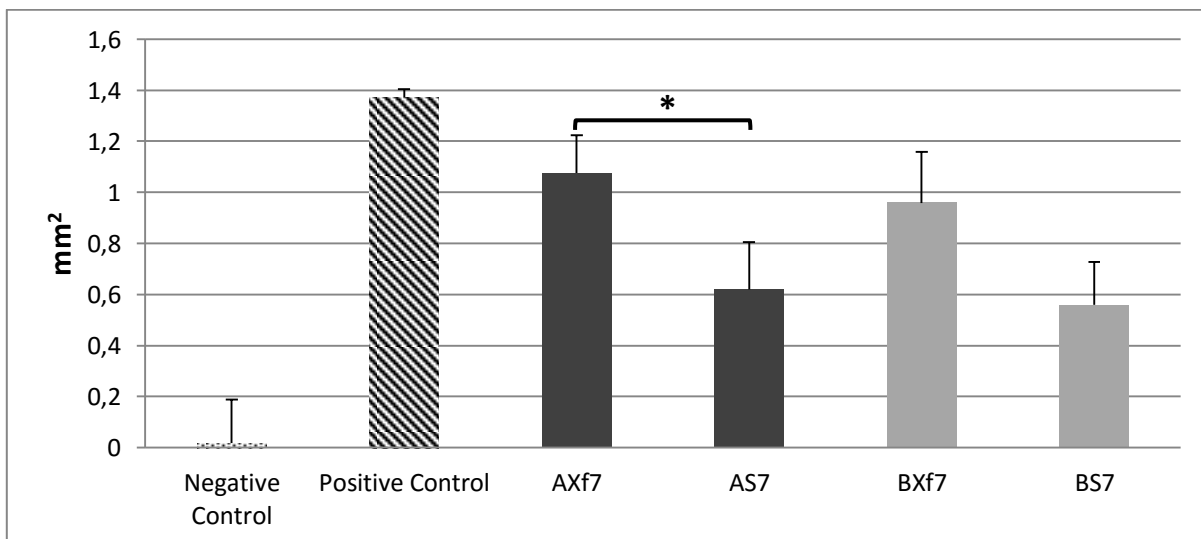
Muestras	AXf4	BXf4	AXf7	BXf7
	0.029	0.022	0.028	0.055

**Significancia estadística del aumento de la cantidad de brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC de hASC de cuarto y séptimo pase producidas en condiciones xeno-free.** Se presenta el valor de p, obtenido mediante test post hoc de Bonferroni de las comparaciones entre los anillos cultivados en MC-Xf y MC-S de cuarto y séptimo pase, para cantidad de brotes angiogénicos surgidos después de nueve días de cultivo.





**Figura 4.40.** Efecto de la producción xeno-free hasta cuarto pase, sobre la cantidad de brotes angiogénicos generados a partir de explantes de aorta murina. Se presenta el área cubierta por brotes angiogénicos, surgidos a partir de explantes de aorta murina cultivados en MC de hASC de cuarto pase producidas en condiciones xeno-free (AXf4 y BXf4) y condiciones estándar (AS4 y BS4). \* $p \leq 0.05$ .



**Figura 4.41.** Efecto de la producción xeno-free hasta séptimo pase sobre la cantidad de brotes angiogénicos generados a partir de explantes de aorta murina. Se presenta el área cubierta por brotes angiogénicos, surgidos a partir de explantes de aorta murina cultivados en MC de hASC de séptimo pase, producidas en condiciones xeno-free (A7L y B7L) y condiciones estándar (A7S y B7S). \* $p \leq 0.05$

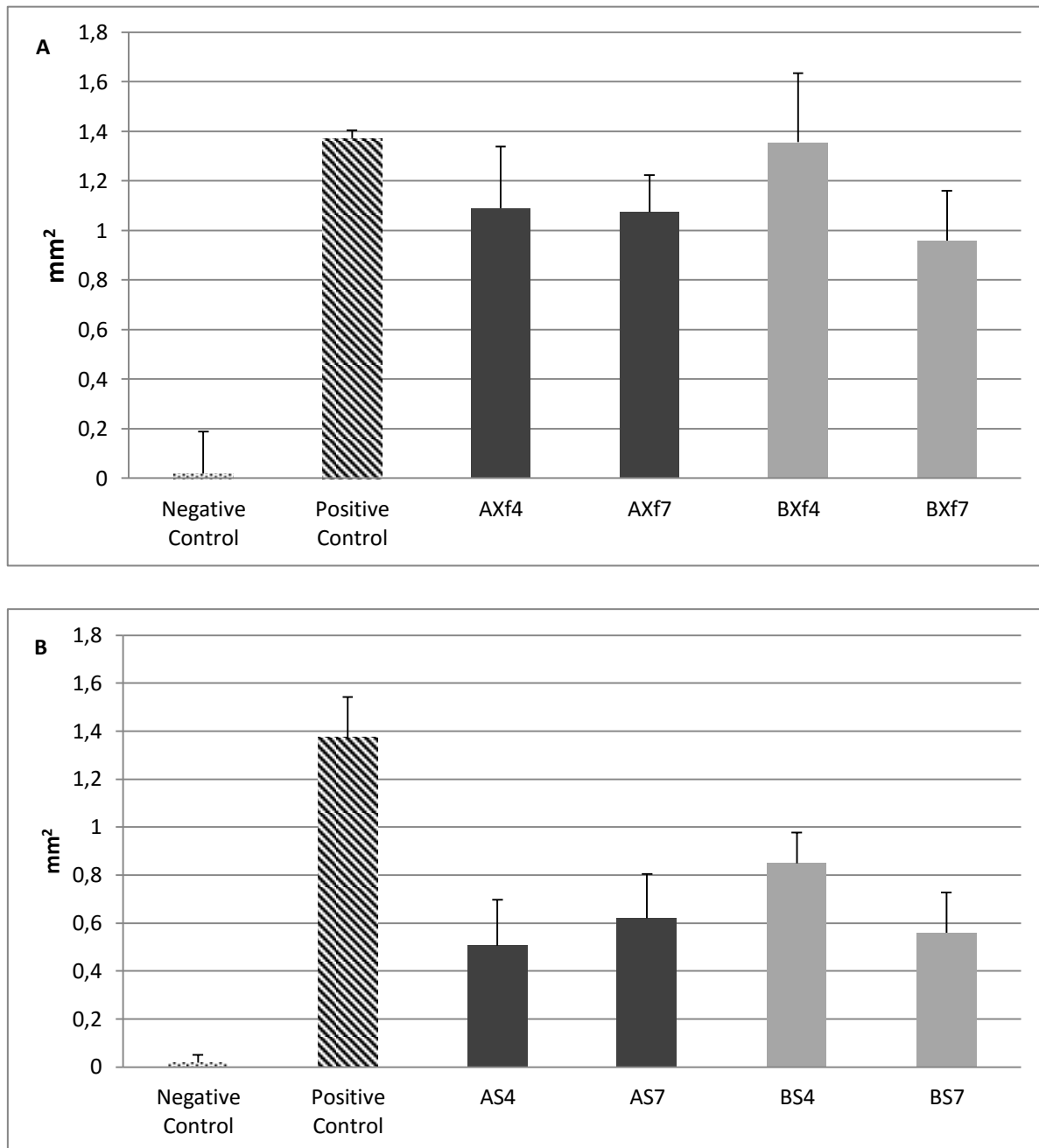
En la figura 4.43 y tabla 4.9 se presentan el efecto funcional de la producción xeno-free hasta séptimo pase sobre la longitud (Fig 4.42A, p muestra A= 0.08; p muestra B= 0.04) y cantidad de ramas (Fig. 4.42B, p muestra A = 0.053; p muestra B= 0.014) de uno de los brotes angiogénicos formados a partir de explantes de aorta cultivados en MC-Xf de hASC de séptimo pase, comparándolos con los brotes angiogénicos surgidos a partir de explantes cultivados en MC-S de hASC.

Sin embargo la producción xeno-free no tuvo efectos significativos sobre la cantidad de ramas (Fig. 4.44A, p muestra A = 0.34; p muestra B= 0.07) o longitud (Fig. 4.44B, p muestra A = 0.38; p muestra B= 0.15) de los brotes angiogénicos formados a partir de los explantes de aorta murina cultivados en MCs de hASC de cuarto pase.

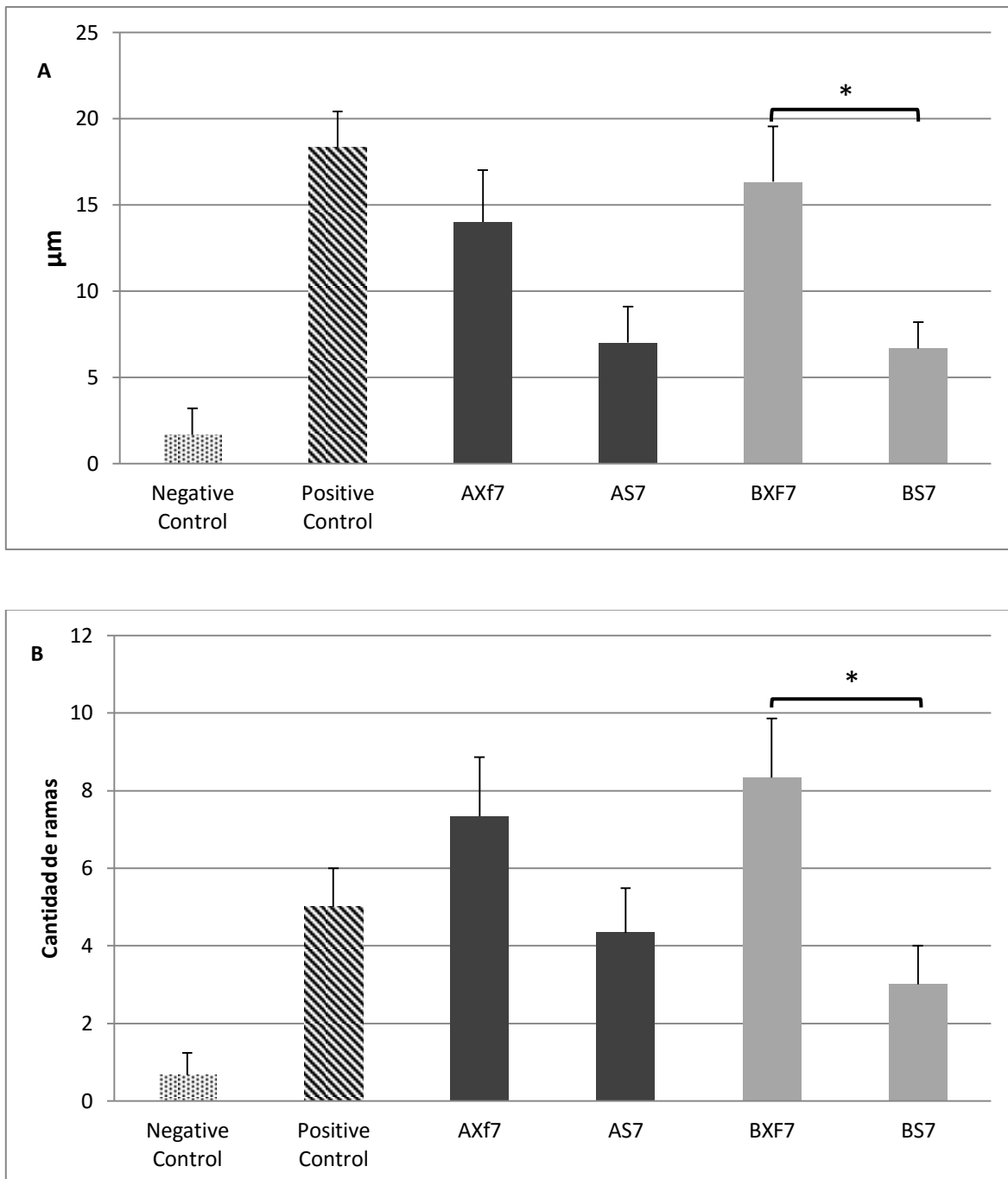
**Tabla 4.9. Análisis estadístico (valor de p) del aumento de la longitud y la cantidad de ramas de uno de los brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC de hASC de séptimo pase producidas en condiciones xeno-free.**

Muestras	Muestra A	Muestra B
Longitud de los brotes	0.08	0.04
Cantidad de ramas	0.053	0.014

**Significancia estadística del aumento de la longitud y cantidad de ramas de uno de los brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC de hASC de séptimo pase producidas en condiciones xeno-free.** Se presenta el valor de p, obtenido mediante test post hoc de Bonferroni de las comparaciones entre los anillos cultivados en MC-Xf y MC-S de séptimo pase, para cantidad de ramas y longitud de los brotes angiogénicos.



**Figura 4.42.** Efecto del pase celular sobre la cantidad de brotes angiogénicos generados a partir de explantes de aorta murina cultivados en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free (A) y condiciones estándar (B), de cuarto y séptimo pase celular.



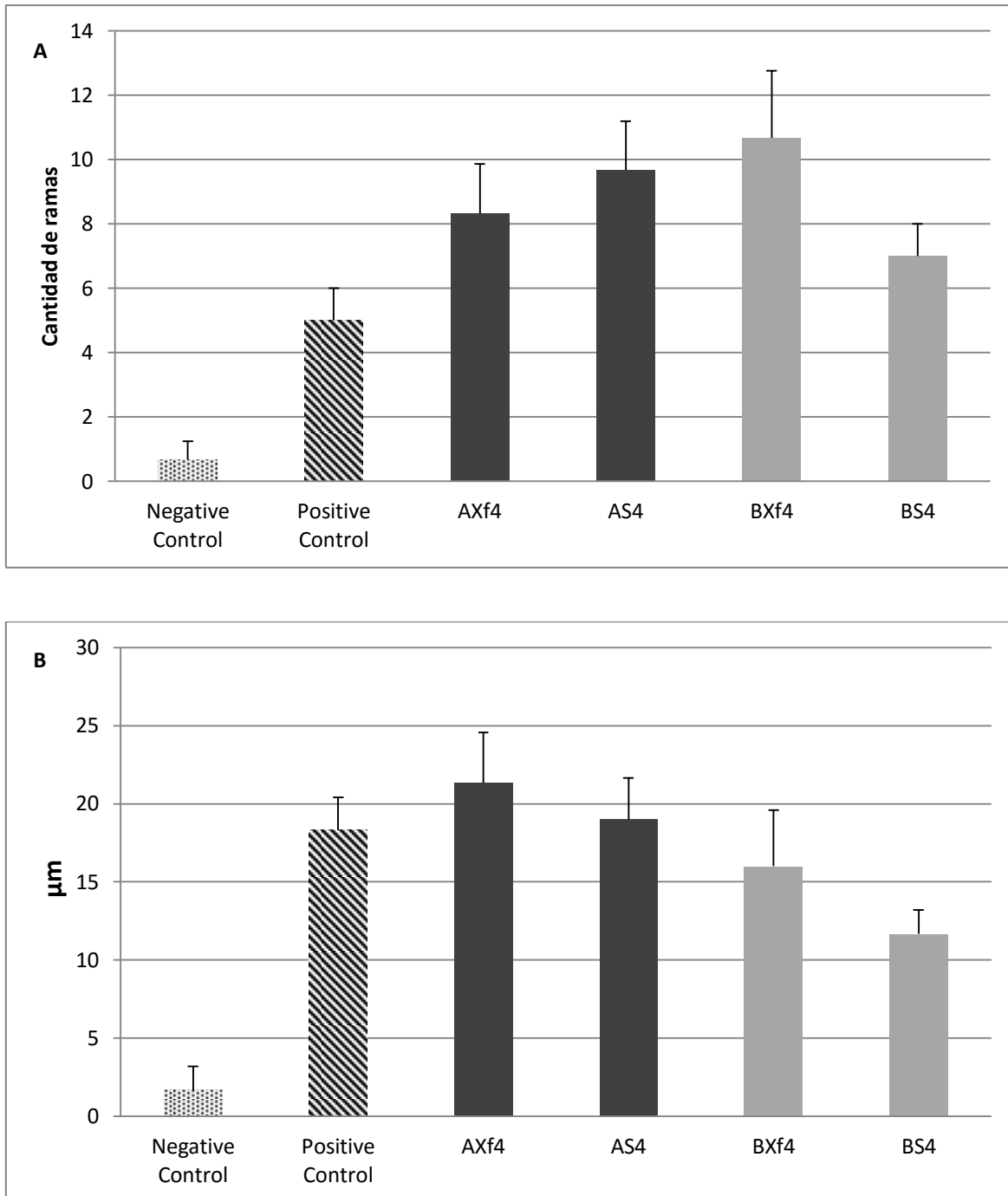
**Figura 4.43. Efecto de la producción xeno-free hasta séptimo pase, sobre la cantidad de ramas (A) y longitud del brote angiogénico (B) formado a partir de explantes de aorta murina cultivados en MC de hASC. MC de hASC de séptimo pase, producidas en condiciones xeno-free (AXf7 y BXf7) y condiciones estándar (A7S y B7S). \*p ≤ 0.05**

**Tabla 4.10. Análisis estadístico (valor de p) de la reducción en la longitud y la cantidad de ramas de uno de los brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC-S de hASC de séptimo pase, frente a MC-S de hASC de cuarto pase.**

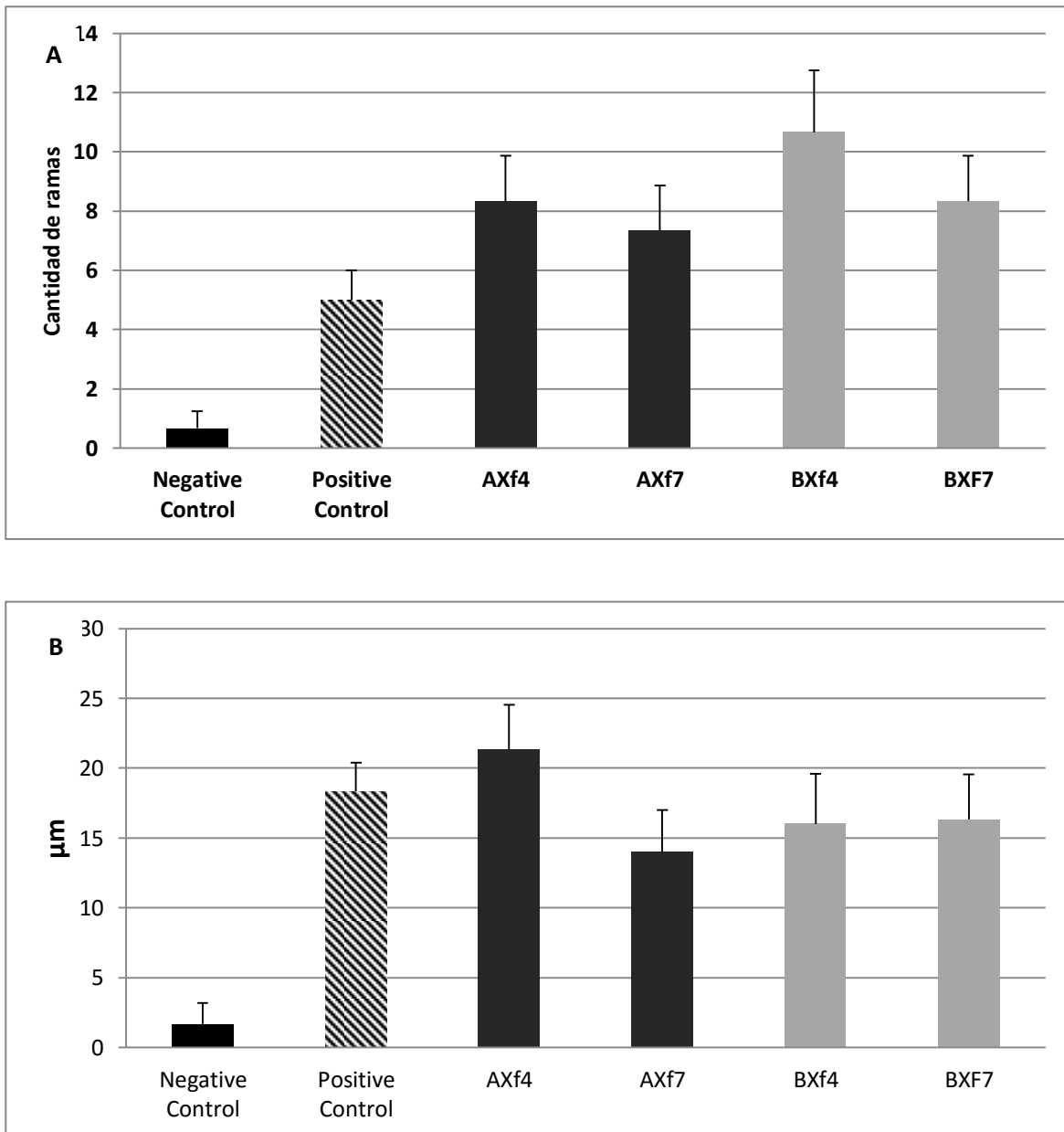
Muestras	Muestra A	Muestra B
Longitud de los brotes	0.013	0.04
Cantidad de ramas	0.010	0.039

**Significancia estadística de la reducción de la longitud y la cantidad de ramas de uno de los brotes angiogénicos surgidos a partir de anillos de aorta cultivados en MC de hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar.** Se presenta el valor de p, obtenido mediante test post hoc de Bonferroni de las comparaciones entre los anillos cultivados en MC-FBS de cuarto y séptimo pase, para cantidad de ramas y longitud de uno de los brotes angiogénicos

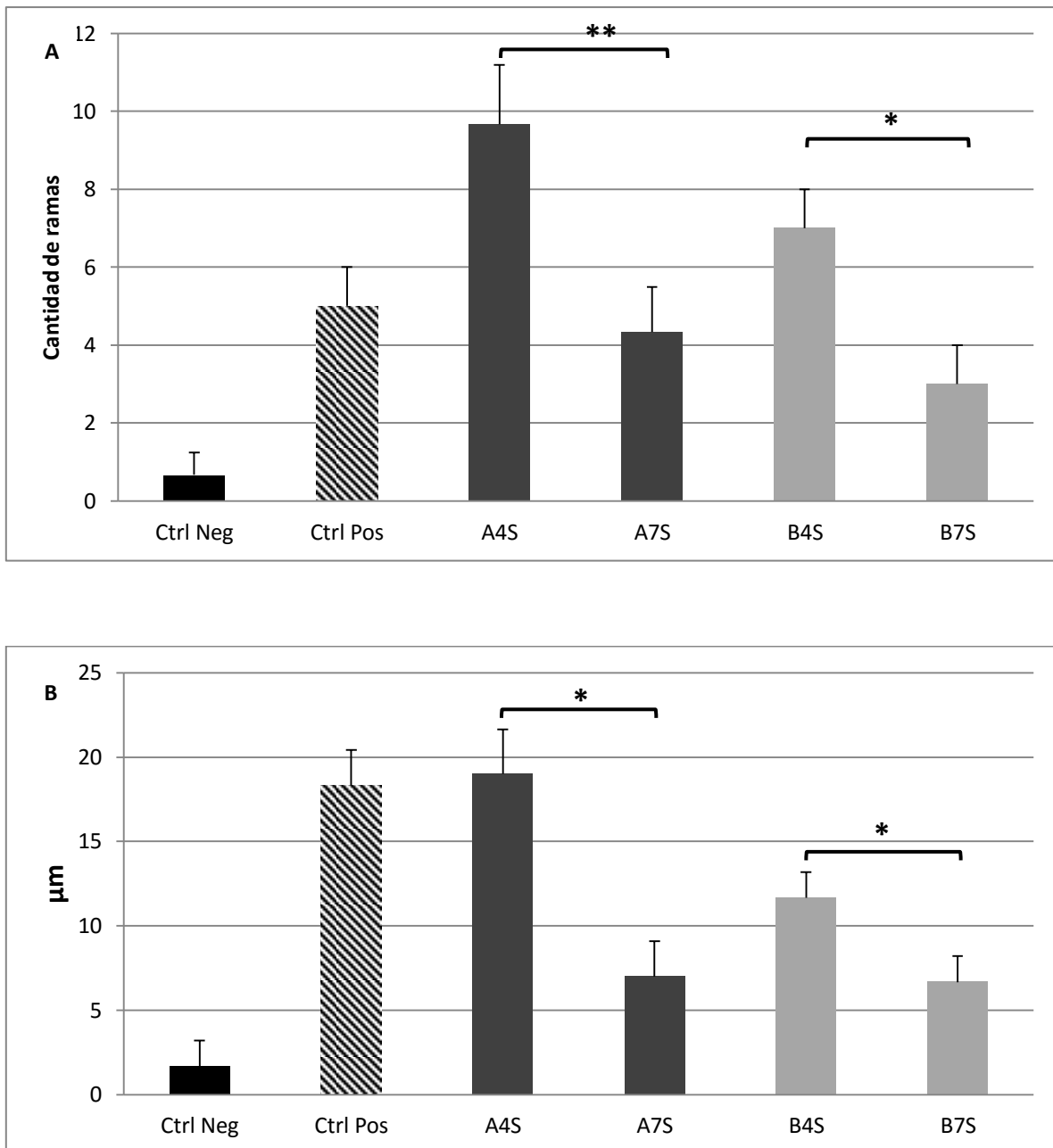
En este modelo experimental, el pase celular también se asoció con la modificación de la capacidad funcional del MC de las hASC producidas en condiciones estándar, y al igual que en el ensayo de matrigel, no se encontró efecto del pase celular bajo condiciones xeno-free de producción celular (Fig. 4.45). En la figura 4.45 se presenta la comparación de la longitud y cantidad de ramas de uno de los brotes angiogénicos surgidos a partir de explantes de aorta cultivados en MC-S de hASC de cuarto y séptimo pase (en la tabla 4.10 se presenta el análisis estadístico). El MC-S de hASC de séptimo pase, indujo la formación de brotes angiogénicos significativamente más cortos (Fig. 4.42A, p muestra A= 0.013; p muestra B= 0.04) y con menor cantidad de ramas (Fig. 4.42B, p muestra A= 0.010; p muestra B= 0.039) que el MC-S de hASC de cuarto pase, resultado que no se encontró al comparar el MC de las hASC producidas en condiciones xeno-free (Fig. 4.45).



**Figura 4.4** Efecto de la producción xeno-free hasta cuarto pase sobre la cantidad de ramas (A) y longitud (B) de uno de los brotes angiogénicos generados a partir de los anillos de aorta murina cultivados en MC de hASC producidas bajo condiciones xeno-free (AXf4 y BXf4) y condiciones estándar (AS4 y BS4).



**Figura 4.45. Efecto del pase celular de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free sobre la cantidad de ramas (A) y longitud (B) de uno de los brotes angiogénicos desarrollados a partir de anillos de aorta murina. Se presenta la comparación de los resultados obtenidos de anillos de aorta cultivados en MC-Xf de hASC de cuarto y séptimo pase.**



**Figura 4.46.** Efecto del pase celular de las hASC producidas bajo condiciones estándar sobre la cantidad de ramas (A) y longitud (B) de uno de los brotes angiogénicos desarrollados a partir de anillos de aorta murina. Se presenta la comparación de los resultados obtenidos de anillos de aorta cultivados en MC-FBS de hASC de cuarto y séptimo pase. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .



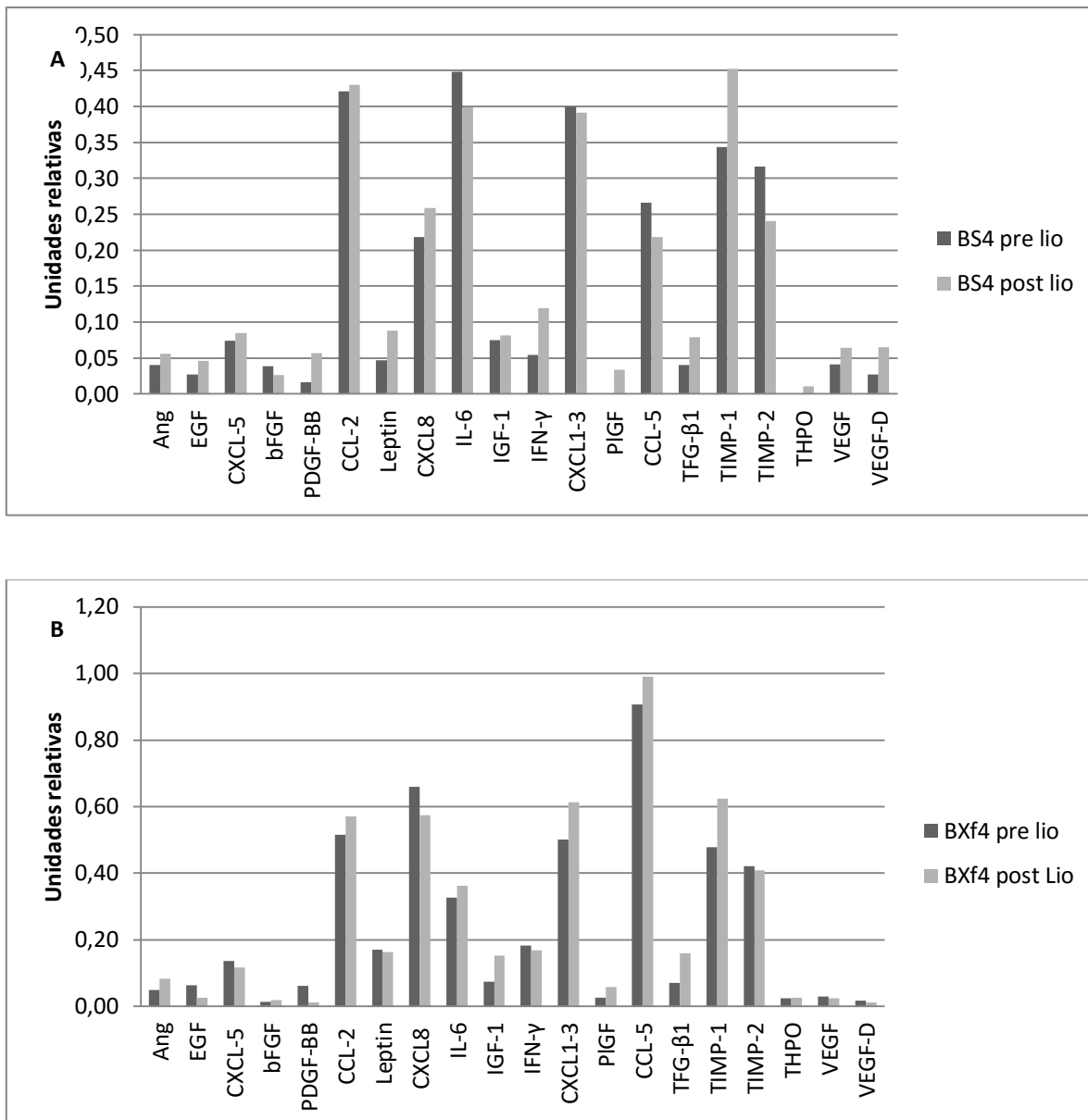
#### 4.4.3. MODELO DE ISQUEMIA TISULAR PERIFÉRICA (IN VIVO).

Además de la participación de células endoteliales y células de músculo liso, el modelo vivo de isquemia tisular periférica, incluye la participación de células madre tisulares (indispensables para el desarrollo de la vasculogénesis), del sistema inmune, y variables hemodinámicas, los cuales están directamente involucrados en el desarrollo y regulación de angiogénesis, arteriogenesis y vasculogénesis.

Con el desarrollo de los experimentos en este modelo, se pretendía caracterizar la capacidad neovascularizante (resultado de la inducción de vasculogénesis, arteriogenesis y/o angiogénesis) de los MC-Xf y MC-S.

La liofilización o deshidro-congelación es un proceso en el cual se extrae el agua de un compuesto mediante sublimación. De esta forma, se pretende conservar la estructura molecular de los solutos eliminando el solvente acuoso y así garantizar la estabilidad de los primeros durante largos períodos de tiempo.

Se evidenció que la liofilización no alteró significativamente la estructura de los epítopes identificados por los anticuerpos del arreglo utilizado en nuestros experimentos, lo cual sugiere que las proteínas de los MCs conservaron su estructura y por ende función. En la figura 4.47 se presenta la comparación de los resultados del primer arreglo de anticuerpos con las dos muestras utilizadas en el ensayo animal antes y después de ser liofilizadas.



**Figura 4.47. Concentración relativa de los factores neovascularizantes detectados en los medios condicionados de la muestra B con el primer arreglo de anticuerpos.** Se presenta la comparación de los resultados obtenidos en las réplicas de los medios condicionados de las células BS4 (A) y BXf4 (B) antes y después de ser liofilizados.

El seguimiento fotográfico de la extremidad posterior de los ratones de los distintos grupos experimentales, evidenció diferencias en el desarrollo de signos de isquemia (Tab. 4.11 y Fig. 4.48).

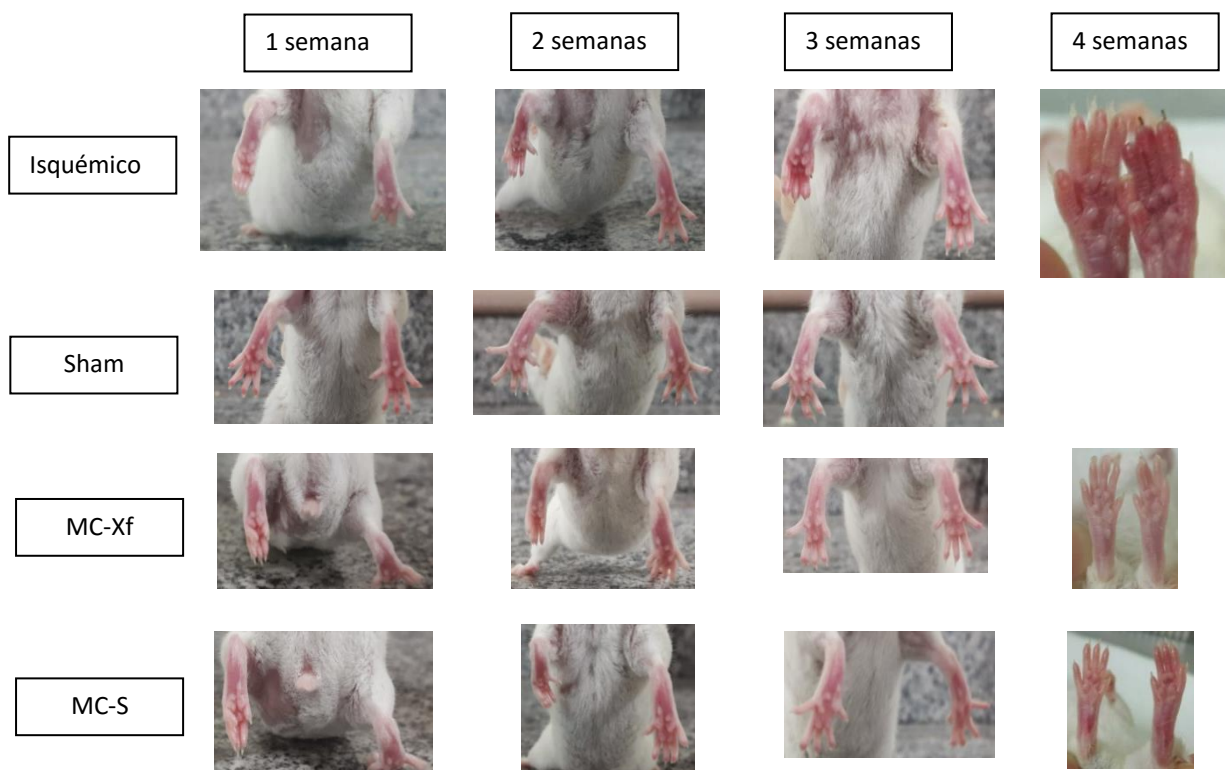
Todos los ratones del grupo isquémico (no tratados) desarrollaron signos evidentes de isquemia en la extremidad intervenida (grado III y dos grado IV), mientras que solo uno de los ratones tratados con MC-S demostró isquemia grado III y a ninguno de los ratones tratados con MC-Xf se le encontró evidencia de isquemia en la extremidad (Tab. 4.11).

El ANOVA de la fuerza ( $F(4,24)=8.61$ ,  $p=0.002$ ) y la masa ( $F(4,24)=23.09$ ,  $p=0.000$ ) del músculo gastrocnemio de la pierna intervenida de los ratones, mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales. La comparación entre los grupos evidenció la reducción significativa de la fuerza del músculo gastrocnemio en los animales no tratados frente a los no intervenidos y tratados, mientras que no hubo cambios significativos en la fuerza de los animales tratados frente a los no intervenidos (Tab 4.12,  $p$  de MC-S vs Isquémicos= 0.0018;  $p$  de MC-S vs Sham= 0.388;  $p$  de MC-Xf vs Isquémicos= 0.00095;  $p$  de MC-Xf vs Sham = 0.99). Figuras 4.49 y 4.50. La masa del músculo también tuvo diferencias significativas en respuesta al tratamiento frente a los animales no tratados (Fig. 4.51). Se encontró reducción significativa de la masa muscular de los animales isquémicos (no tratados) respecto a los animales no intervenidos y los animales tratados (Tab. 4.12,  $p$  de MC-Xf vs Isquémicos= 0.00028 y  $p$  de MC-S vs Isquémicos= 0.001), aunque estos últimos también presentaron una reducción significativa frente a los no intervenidos ( $p$  de MC-S vs Sham= 0.0035).

**Tabla 4.11. Clasificación de los resultados del seguimiento fotográfico de los ratones incluidos en los grupos experimentales**

Grado de isquemia	Descripción	Isquémico	Sham	Sham OptiMEM	MC-Xf	MC-S
I	Sin signos de isquemia	0	5	8	4	2
II	Extremidad pálida no contracturada	0	0	0	3	3
III	Extremidad contracturada e inutilizada	2	0	0	0	2
IV	Uñas negras y necrosis de la extremidad	3	0	0	0	0

Se presenta la cantidad de animales de cada grupo experimental y su distribución en función de la demostración de signos tisulares de isquemia.



**Figura 4.48. Fotografías representativas de las extremidades posteriores de ratones de cada grupo experimental.** Se observa la extremidad intervenida (izquierda) en comparación con la extremidad no intervenida después de una, dos, tres y cuatro semanas de la intervención.

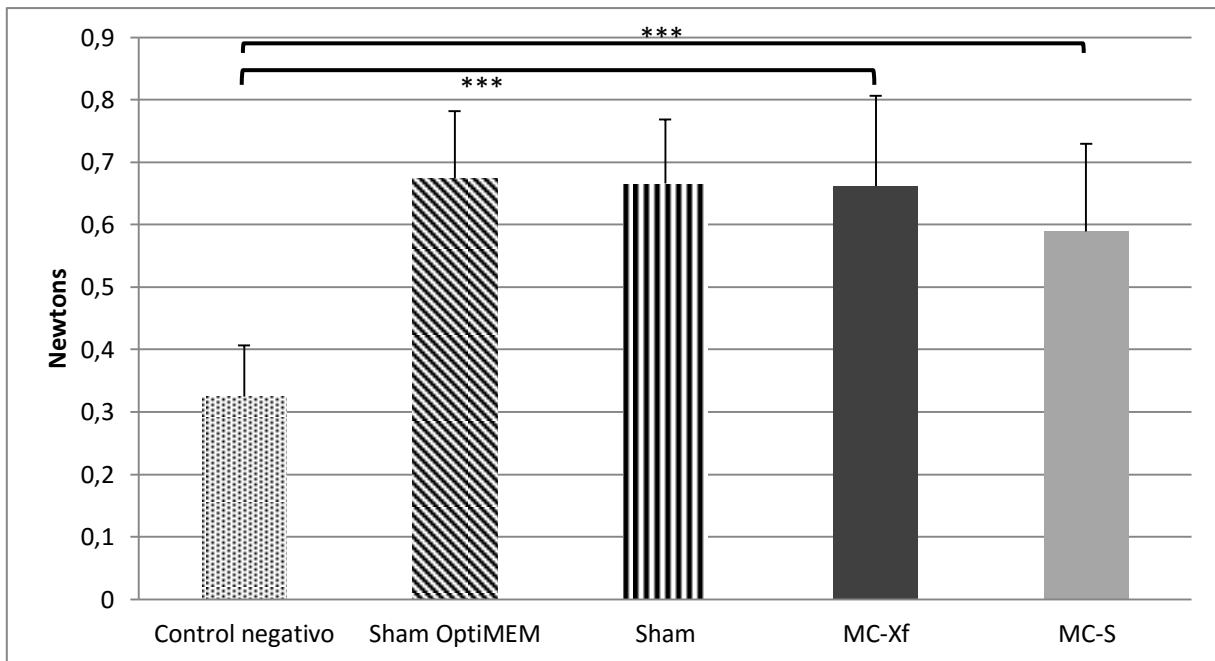


**Figura 4.49.** Imagen de un ratón al que se le retiró la piel de la cara posterior de la pierna intervenida y el glúteo mayor, para exponer el músculo gastrocnemio (cabeza de flecha) y el nervio ciático (flecha), el cual fue estimulado eléctricamente para cuantificar la fuerza del gastrocnemio.

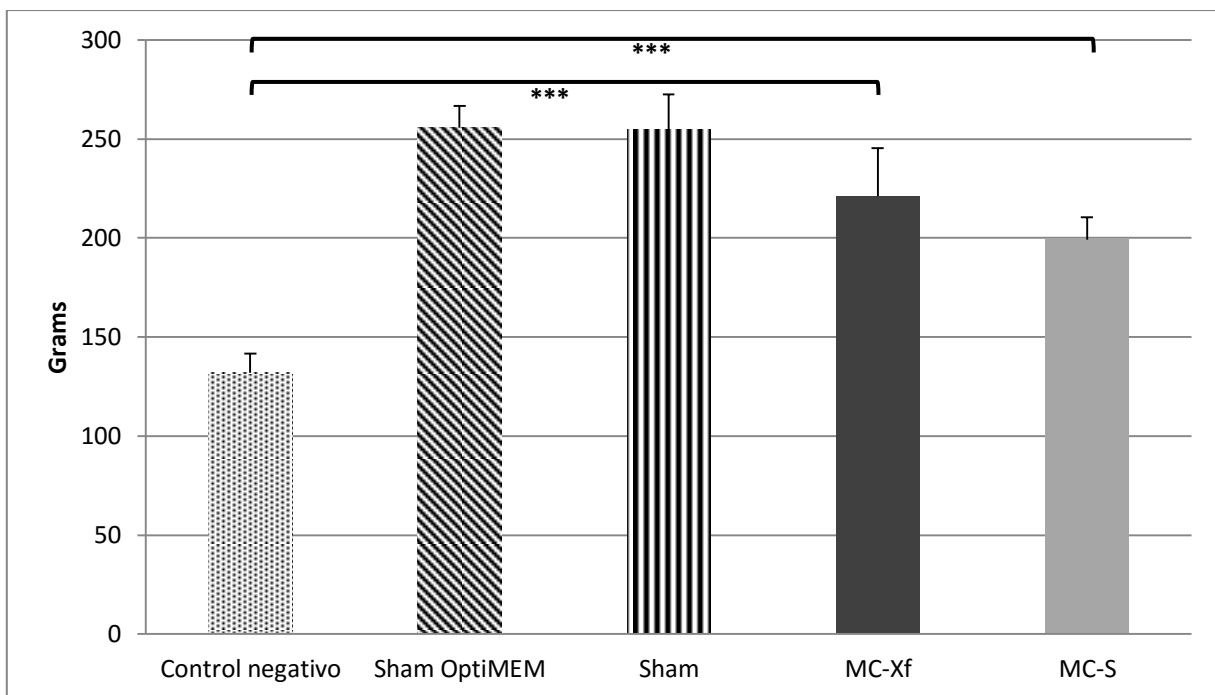
**Tabla 4.12.** Análisis estadístico (valor de p) de las diferencias entre los grupos experimentales del modelo animal isquemia tisular periférica.

Cruce	Ctrl Neg vs Ctrl Pos	Ctrl Neg vs MC-S	Ctrl Neg vs MC-Xf	Ctrl Pos vs MC-S	Ctrl Pos vs MC-Xf
Fuerza muscular	0.001	0.009	0.001	1.000	1.000
Masa Muscular	0.000	0.002	0.000	0.003	0.195

**Significancia estadística de las diferencias funcionales entre los grupos experimentales del modelo animal de isquemia tisular periférica.** Se presenta el valor de p, obtenido mediante test post hoc de Bonferroni de las comparaciones entre los diferentes grupos experimentales del modelo animal.



**Figura 4.50. Fuerza del músculo gastrocnemio de la pierna intervenida. Se presenta la fuerza en Newtons, cuantificada en respuesta al estímulo eléctrico. \*\*\* $P \leq 0.001$**



**Figura 4.51. Masa del músculo gastrocnemio de la pierna intervenida. Se presenta la fuerza en Newtons, cuantificada en respuesta a un estímulo eléctrico. \*\*\* $P \leq 0.001$**

**Caracterización histológica:**

En un microscopio Leica DM 1000, se revisaron los cortes histológicos de los diferentes grupos experimentales

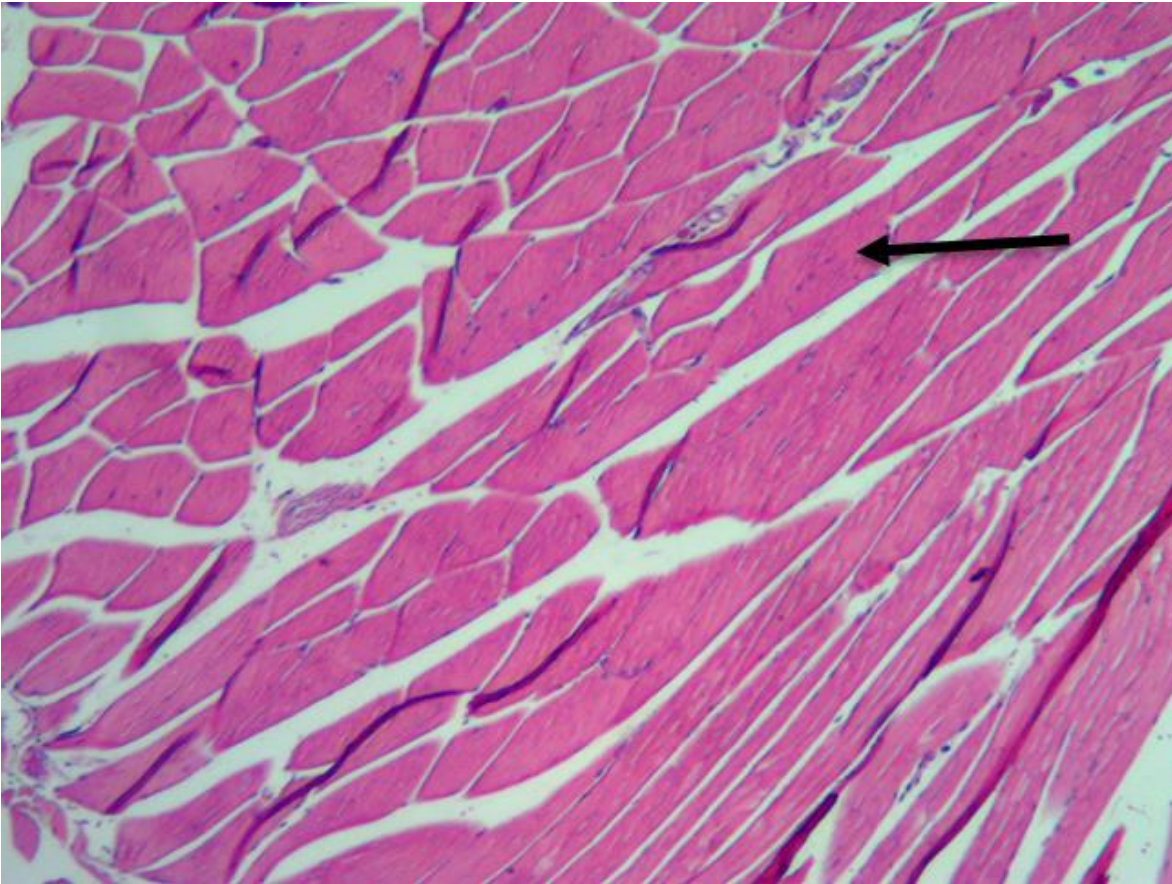
Todos los cortes histológicos correspondientes a los grupos control Sham y Control OptiMEM evidenciaron características histológicas normales con fibras musculares de núcleos periféricos sin pérdida de masa, sin signos de atrofia o infiltrado inflamatorio y con adecuada vascularización. (Fig. 4.52).

Por su parte, todos los cortes de los animales intervenidos sin tratamiento (control negativo) demostraron cambios generalizados sugestivos de atrofia muscular, con fibras musculares de diferente tamaño y cambio graso (Fig. 4.53). En la coloración de tricromo se evidencio fibrosis y proliferación de fibroblastos (Fig. 4.54)

Del grupo tratado con MC-Xf, se evidenciaron 2 muestras con histología normal y 6 muestras con focos aislados de cambios sugestivos de atrofia, pero con evidencias de proliferación de células endoteliales, lo cual sugiere revascularización (Fig. 4.55).

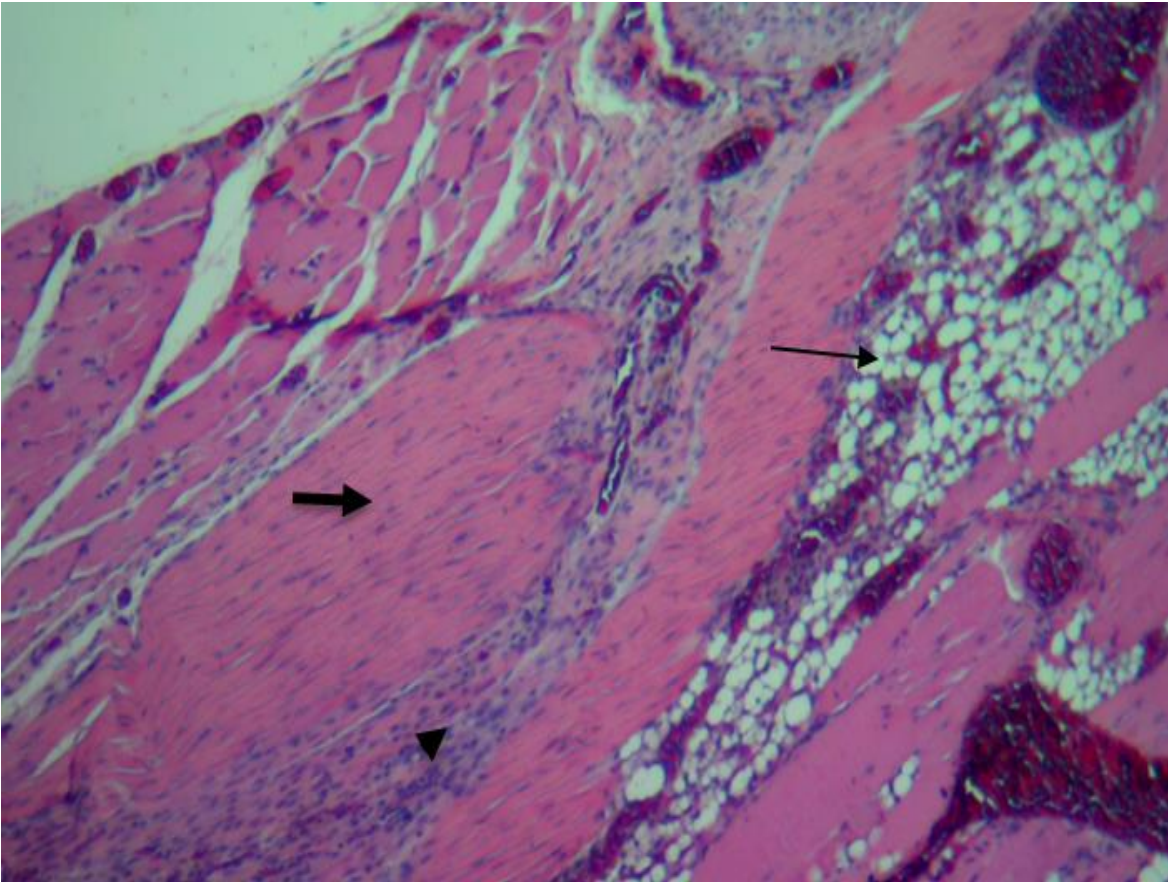
Finalmente, en los cortes histológicos del grupo tratado con CM-S, de un total de 7 muestras, una muestra evidenció características histológicas propias de músculo normal y las 6 restantes presentaron focos aislados de cambios sugestivos de atrofia.



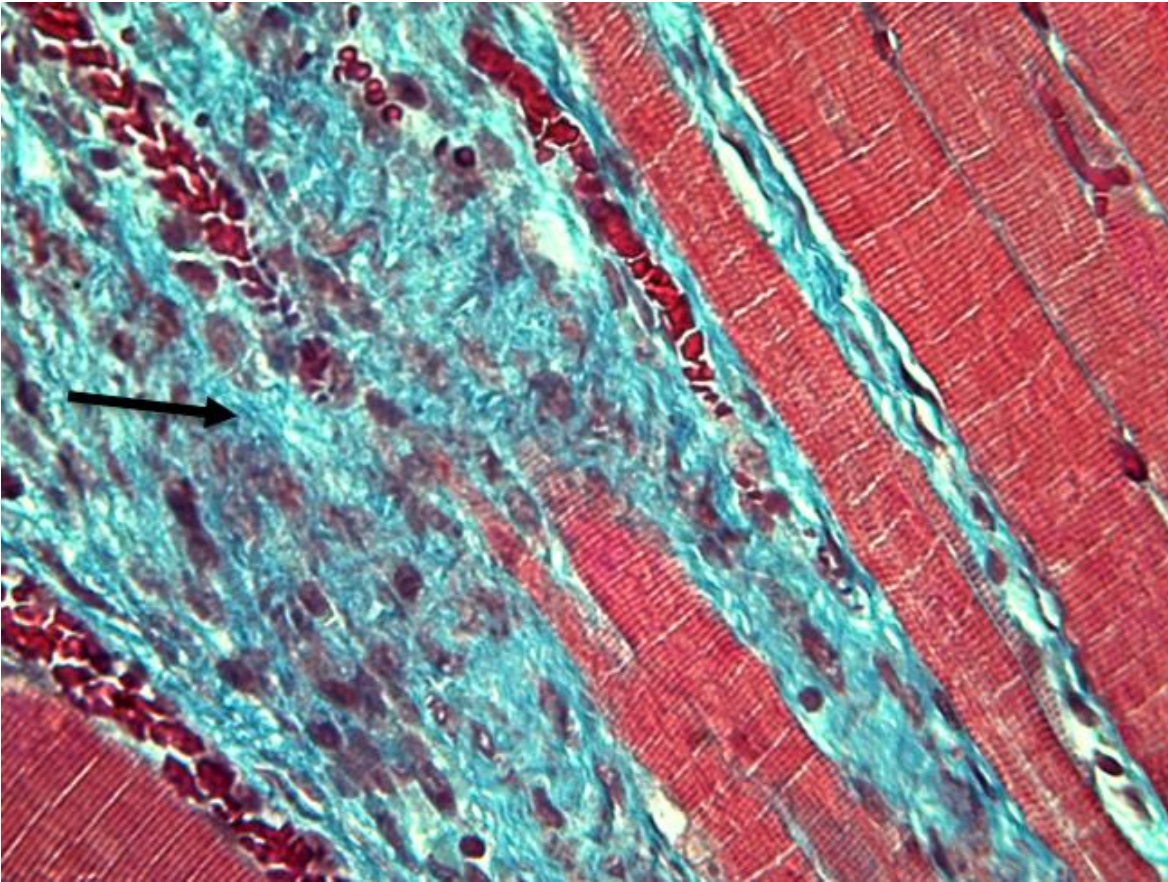


**Figura 4.52. Tinción de H&E de una muestra del gastrocnemio de un ratón tratado con MC-Xf:** Fibras musculares murinas histológicamente normales, homogéneas, con núcleos periféricos sin evidencia de infiltrado inflamatorio, ni cambio grasoso.



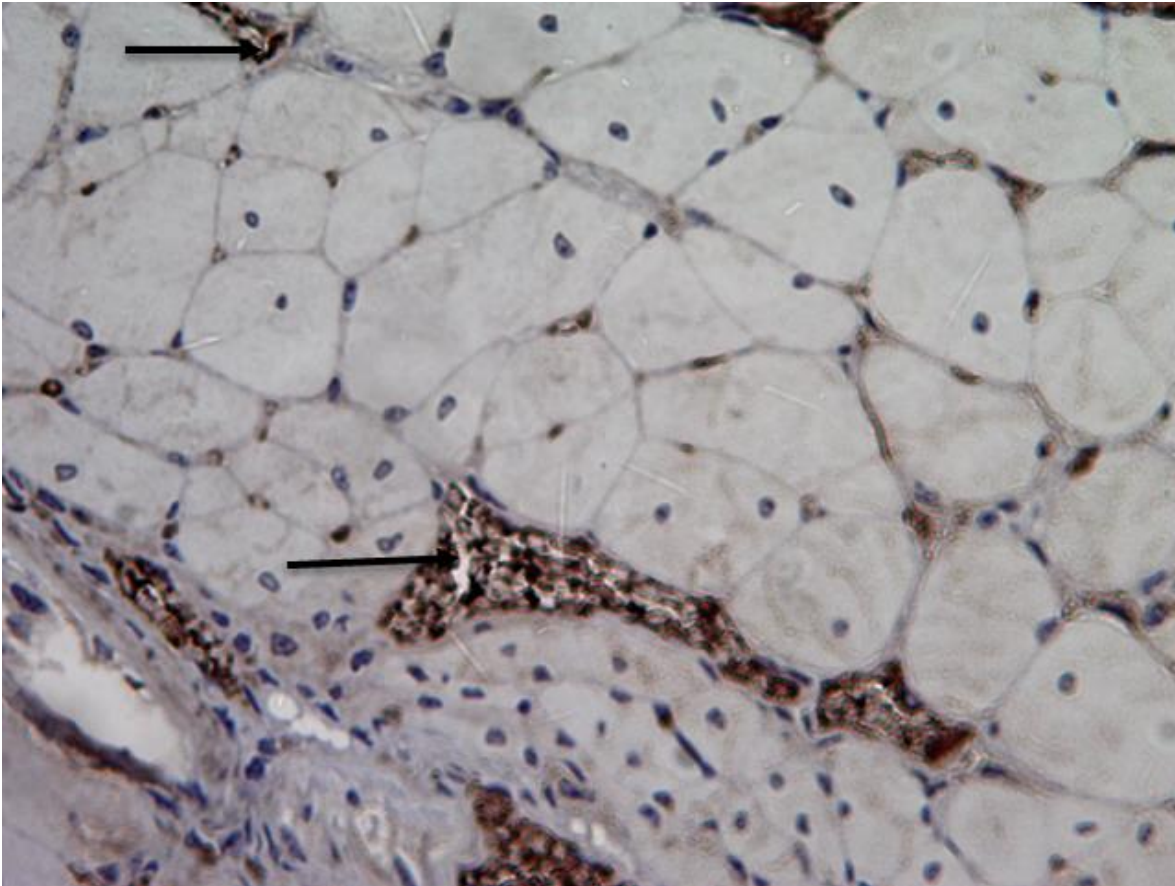


**Figura 4.53. Tinción de H&E de una muestra del gastrocnemio de un ratón no tratado:** Se evidencian signos histológicos de atrofia, con fibras musculares pequeñas (flecha gruesa), infiltrado inflamatorio mononuclear (cabeza de flecha) y cambio graso (flecha delgada)



**Figura 4.54.** Tinción de tricromo de una muestra del gastrocnemio de un ratón no tratado. Se muestra proliferación fibroblástica en músculos atróficos (flecha). Nótese las estrías musculares en las fibras viables.





**Figura 4.55.** Estudio de inmunohistoquímica contra CD31, en el músculo de un ratón tratado con MC-Xf. Se evidencia proliferación endotelial (flechas).

---

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Las MSC como alternativa terapéutica para la regeneración tisular, son una propuesta que ha generado importantes expectativas tanto en la comunidad científica como en la comunidad general. Aunque los resultados de los ensayos clínicos siguen siendo sub-óptimos (Squillaro, et al., 2015), se acepta que estas células favorecen la regeneración tisular requerida en condiciones tan variadas como el Infarto Agudo de Miocardio, Trauma raquímedular y fracturas complejas.

Esta regeneración podría ser producto de diferentes mecanismos, aunque la capacidad funcional de factores tróficos liberados por las ellas (y especialmente aquellos con capacidad neovascularizante), parece ser uno de los principales (Gnecchi, et al., 2012). Aunque es abundante la evidencia que sugiere que la sustitución celular, gracias a su capacidad de proliferación y diferenciación, no es el principal mecanismo de regeneración inducido por las MSC (Prockop, 2007), tampoco puede descartarse que los resultados reportados se deban, al menos en parte, a este mecanismo.

La producción (extracción, cultivo y criopreservación) de MSCs, es un complejo proceso que implica su manipulación sustancial, y rutinariamente considera el uso de sustancias que podrían significar un riesgo para las personas que las reciban, incluso de forma autóloga. Su producción para fines terapéuticos, debe desarrollarse cumpliendo con los más altos estándares de calidad y eliminar factores de riesgo para los pacientes, es

importante en el camino de su implementación. Aunque se acepta que las MSC son seguras como alternativa terapéutica para seres humanos, se ha evidenciado la existencia de algunos factores de riesgo particularmente relacionados con las condiciones bajo las cuales son manipuladas, incluyendo las sustancias utilizadas para ello.

Sustituir el FBS con hPL para la producción de hASC, y por lo tanto eliminar los riesgos relacionados con su uso, es un paso importante para la viabilización de la terapia regenerativa con MSCs para seres humanos. No obstante, cambiar un elemento tan importante en la producción de estas células, podría ocasionar cambios importantes en sus capacidades terapéuticas, lo cual depende, al menos parcialmente, de su perfil paracrino o secretoma.

Demostrar la capacidad neovascularizante de las hASC xeno-free es importante para la terapia celular en medicina regenerativa, entendiendo que las hASC son células de mayor seguridad para su aplicación en seres humanos, teniendo en cuenta además la abundante evidencia que asocia la capacidad neovascularizante de estas células, con la regeneración tisular inducida por ellas en modelos clínicos y preclínicos.

Los datos aquí presentados demuestran que el secretoma de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free, tiene capacidad neovascularizante cuando menos igual al de las hASC producidas bajo condiciones estándar. En el modelo in vitro, los MC-Xf de cuarto pase celular demostraron una capacidad significativamente inferior de inducir la formación de nodos (Fig 4.28A, p muestra A= 0.006; p muestra B= 0.01), sin embargo en

séptimo pase se encontró aumento significativo de la capacidad proangiogénica de los MC-Xf, lo cual se evidenció en el aumento significativo de la cantidad de nodos (Fig. 4.29, p de la muestra A=0.018; p de la muestra B=0.011), uniones (Fig. 4.30, p de la muestra A= 0.007; p de la muestra B = 0.011), uniones maestras (Fig. 4.31, p de la muestra A= 0.012; p de la muestra B= 0.000) y segmentos maestros (Fig. 4.33, p de la muestra A= 0.034; p de la muestra B= 0.007), formados por las células endoteliales cultivadas en los MC-Xf.

En el modelo ex vivo, se evidenció que la producción xeno-free se asoció con un aumento significativo de la capacidad neovascularizante de las hASC de cuarto y séptimo pase. En las figuras 4.40 y 4.41 se muestra el aumento significativo de la cantidad de brotes angiogénicos surgidos a partir de los explantes de aorta murina cultivados en MC-Xf, comparado con lo obtenido en los explantes cultivados en MC-S (p de la muestra A en cuarto pase: 0.029; p de la muestra B en cuarto pase: 0.022; p de la muestra A en séptimo pase: 0.028; p de la muestra B en séptimo pase: 0.055).

Finalmente, en el modelo animal se evidenció, mediante pruebas indirectas (fuerza y masa muscular), la revascularización de la extremidad posterior tanto en el grupo de animales tratados con MC-S como aquellos tratados con MC-Xf (Figs. 4.50 y 4.51). Sin embargo, se encontró mejor recuperación de la masa muscular en los animales tratados con MC-Xf (Fig. 4.51).

Estos resultados sugieren que aunque la producción xeno-free hasta cuarto pase se asoció con la reducción de la concentración de un amplio grupo de factores pro-

neovascularizantes (incluyendo a IGF-1 y VEGF), la capacidad funcional del secretoma se mantuvo e incluso aumentó en algunos ensayos implementados por nosotros. Evidentemente, la capacidad neovascularizante del secretoma de las hASC es el resultado del efecto combinado de los factores de actividad pro-neovascularizante y anti-neovascularizante. Aunque es amplio el grupo de factores de capacidad pro-neovascularizante que disminuyeron su concentración en los MCs en respuesta a la producción xeno-free (Tab. 5.1), algunos factores de potente efecto anti-neovascularizante como los factores inhibidores de metaloproteinasas (TIMP 1 y 2), además de las formas solubles de los receptores de Angiopoyetina (Tie-2) y VEGF (VEGFR2 y 3), redujeron su concentración en los MCs de ambas muestras en respuesta a la producción xeno-free en ambos pases celulares, lo cual podría aumentar el efecto funcional de los factores pro-neovascularizantes y explicar el aumento de la capacidad funcional de los MCs estudiados en los ensayos funcionales desarrollados por nosotros (Tab. 5.1).

Llama la atención la diferencia en el resultado obtenido con los CM de cuarto pase, en el ensayo de matrigel (in vitro) y el ensayo de anillos de aorta (ex vivo).

El resultado del primero tiene una relación directa con la actividad de factores pro-angiogénicos que inducen la proliferación, migración y organización de células endoteliales, y se ha descrito que su resultado depende en gran medida de la actividad de VEGF. Nosotros encontramos que el MC-Xf4 de hASC extraídas de ambas muestras, tuvo una menor concentración de factores con probada capacidad pro-angiogénica como

VEGFA y D, IGF-1, angiopoyetina 1 y 2, CCL-2 y 13, angiogenina, Il-2, 6 y 8, además de las metaloproteinasas MMP-1 y 9, además de mayor concentración de dos factores antiangiogénicos (CXCL-11 e IFN- $\gamma$ ). Todo esto podría explicar la menor actividad proangiogénica de los MC-Xf4 en el ensayo de matrigel.

De otra parte, en el resultado del ensayo de anillos de aorta influye la capacidad de los MCs sobre las células de músculo, además de las células endoteliales que naturalmente están presentes en el endotelio vascular. El resultado de este ensayo también tiene relación con la inducción de la proliferación y migración de células endoteliales, pero además con la inducción de proliferación, migración y organización de células de músculo liso vascular y la ruptura de la matriz permitiendo la formación de los brotes angiogénicos. Ya se ha reportado que algunos de los factores que vieron aumentada su secreción por parte de las hASC en respuesta a la producción xeno-free, como PDGF-BB, EGF (Beamish, et al., 2010) y CCL-1 (Haque, et al., 2004), tienen una importante capacidad proarteriogénica, induciendo la proliferación y migración de células de músculo liso (Beamish, et al., 2010, Gerthoffer, 2007, Haque, et al., 2004), además de la secreción de metaloproteinasas (Haque, et al., 2004), enzimas indispensables para el correcto desarrollo de este proceso.

No obstante, vale la pena considerar que la capacidad pro-neovascularizante in vivo, es resultado del efecto sobre diferentes poblaciones celulares incluyendo células del sistema inmune y células madre locales, además de las ya mencionadas células endoteliales y de músculo liso vascular. Las MSC liberan un amplio espectro de moléculas incluyendo



proteínas y ácidos nucleicos, y nuestros resultados se circunscriben a las 43 proteínas identificadas con el arreglo de anticuerpos. Cabe la posibilidad de que la producción xeno-free aumente la liberación de grupos de moléculas no estudiadas con los arreglos de anticuerpos, pero que modifiquen los resultados alcanzados en los diferentes modelos experimentales implementados por nosotros, lo cual podría modificar la correlación entre los resultados de los análisis cuantitativos y funcionales del secretoma estudiado.

Igualmente, vale la pena considerar que son varios los mecanismos por los cuales se ha propuesto que las MSC induzcan la regeneración tisular, los cuales incluyen inmunomodulación, modulación metabólica y activación de células madre locales, además de la neovascularización (Fig. 1.2). Aunque nuestros resultados solo evalúan la capacidad neovascularizante de las hASC xeno-free, estos resultados permiten suponer que la producción xeno-free tenga un impacto similar sobre las demás capacidades que se han descrito a las MSC y que han sido relacionadas con su capacidad de inducir la regeneración tisular, lo cual tendría que ser evaluado en experimentos posteriores.

La cantidad de células que habitualmente son usadas para medicina regenerativa, obliga a cultivarlas por un lapso importante de tiempo, lo cual ha demostrado estar correlacionado con la pérdida de las características que las hacen atractivas como alternativa terapéutica. Nosotros encontramos que las células de séptimo pase producidas bajo condiciones estándar tienen menor capacidad neovascularizante que las células de cuarto pase, sin embargo, el pase celular no tuvo este efecto bajo condiciones xeno-free de producción celular.

En las figuras 4.32 a 4.36 se muestra el efecto funcional del pase bajo condiciones estándar de producción celular, en el modelo de matrigel. Puede notarse como las células endoteliales cultivadas en MC-S de hASC de séptimo pase, formaron una cantidad significativamente menor de nodos ( $p$  de la muestra A= 0.00094;  $p$  de la muestra B= 0.000), uniones ( $p$  de la muestra A= 0.000;  $p$  de la muestra B= 0.007) y uniones maestras ( $p$  de la muestra A= 0.0003;  $p$  de la muestra B= 0.000), mientras que la comparación de los resultados obtenidos con los MC-Xf de cuarto y séptimo pase no arrojó diferencias.

En el modelo ex vivo, también se evidenció reducción de la capacidad neovascularizante de los MC-S de hASC de séptimo pase. Este resultado se hizo visible en la reducción de la longitud (Fig. 4.45A,  $p$  muestra A= 0.013;  $p$  muestra B= 0.04) y cantidad de ramas (Fig. 4.45B,  $p$  muestra A= 0.010;  $p$  muestra B= 0.039) emitidas por uno de los brotes angiogénicos surgidos a partir de los explantes de aorta, aunque no se encontraron diferencias respecto a la cantidad de brotes angiogénicos (Fig. 4.41B).

Ya se ha reportado que las hASC pierden paulatinamente su capacidad de proliferación (Wu, et al., 2014) y diferenciación (Di Battista, et al., 2014) a medida que aumenta su pase celular y por ende sus doblajes poblacionales en cultivo in vitro. No existen reportes previos donde se evalúe la capacidad neovascularizante de las hASC en función de su pase celular, sin embargo nuestros resultados con las células producidas bajo condiciones estándar pueden guardar relación con los cambios ya reportados respecto a la capacidad de proliferación y diferenciación de las MSC en relación con el pase celular.

Se ha sugerido que el pase celular tenga asociación directa con la pérdida de las capacidades funcionales de las MSC, lo cual ha hecho pensar que pierdan su atractivo terapéutico. Nuestros resultados demuestran que las hASC producidas bajo condiciones estándar, aumentan la secreción de factores de efecto anti-neovascularizante, lo cual tuvo relación con la pérdida de la capacidad funcional en los tres modelos experimentales implementados por nosotros.

De otra parte, se ha sugerido que el hPL retrasa la senescencia celular característica de las células cultivadas en medios suplementados con FBS, considerando los reportes respecto a la asociación que existe del cultivo con este suplemento y la reducción de expresión de B-galactosidasa (Griffiths, et al., 2013). Además, se sabe que el tamaño de las MSC tiene una relación inversa con su potencial de proliferación y diferenciación (Bianco, et al., 2008). Sistemáticamente se ha reportado que las MSC cultivadas en medios suplementados con hPL presentan menor tamaño y mayor capacidad de proliferación que aquellas cultivadas en medios suplementados con FBS (Doucet, et al., 2005, Griffiths, et al., 2013, Schallmoser, et al., 2007). Esto podría considerarse como un “envejecimiento” más lento de las células cultivadas en hPL, lo cual concordaría con los resultados de nuestros experimentos funcionales.

En ninguno de los tres modelos experimentales implementados por nosotros, se detectaron cambios significativos en la capacidad neovascularizante asociados al pase celular de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free, lo cual podría interpretarse como una demostración más de que el hPL retrasa el deterioro funcional de las células en

cultivo, resultado que contrasta claramente con los obtenidos con las células producidas bajo condiciones estándar.

Por todo lo anterior, puede concluirse que esta evidencia demuestra que las hASC xeno-free de hasta séptimo pase, conservan su capacidad neovascularizante, lo cual sugiere que las hASC producidas bajo estas condiciones podrían ser repicadas hasta siete veces para su aplicación con fines terapéuticos en seres humanos.

## 5.2. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL LISADO PLAQUETARIO HUMANO

El suplemento del medio basal de cultivo celular con FBS u otro tipo de compuesto de origen animal, tiene como objetivo brindar hormonas y factores de crecimiento que garanticen la proliferación y desarrollo de funciones celulares particulares, proteínas de transporte que movilicen hormonas, minerales y lípidos, factores de unión y migración, aminoácidos y vitaminas, ácidos grasos y lípidos, inhibidores de proteasas y factores de regulación de presión osmótica (Gstraunthaler, 2003).

Ya se conoce el potencial del hPL como sustituto del FBS para el cultivo de MSC, sin embargo, la formación de coágulos de fibrina ha sido uno de las principales dificultades en su implementación para la extracción, cultivo y criopreservación de estas células. Nuestro protocolo de producción de hASC se fundamenta en el uso de hPL producido a partir de unidades de plaquetas vencidas, validadas por bancos de sangre aprobados por el ministerio de salud y protección social.

Nuestro hPL puede ser usado como componente base para la producción y criopreservación de hASC, debido a que la reducción en la concentración de proteínas del plasma sanguíneo hace innecesario el uso de anticoagulantes.

Entendiendo que la capacidad funcional del hPL se fundamenta en el efecto de factores tróficos de los gránulos plaquetarios, nosotros retiramos el plasma presente en las unidades de plaquetas, antes de lisarlas mediante ciclos de congelación y descongelación. De esta forma se redujo la cantidad de fibrinógeno en el producto y por lo tanto la formación de coágulos de fibrina.

Ya se ha reportado la producción de suero a partir del hPL, induciendo su coagulación, para posteriormente extraer el sobrenadante (Mojica-Henshaw, et al., 2013). Aunque en ese trabajo se demostró la conservación del efecto sobre las MSC, también se documentó la significativa reducción de la concentración de PDGF-BB, lo cual podría modificar el fenotipo las células cultivadas por largos períodos de tiempo, considerando la importancia de PDGF-BB en la preservación del fenotipo de las MSC, y especialmente el de las ASC (Fierro, et al., 2007, Kim, et al., 2015, Lopatina, et al., 2014).

No existe unanimidad respecto al protocolo de producción del hPL, sin embargo se han identificado algunas de las proteínas que lo componen. Factores de crecimiento como PDGF-BB, EGF, TGF- $\beta$ , bFGF, VEGF e IGF-1 han sido detectados en preparaciones reportadas de hPL. No obstante, se acepta que la composición del hPL es mucho más compleja, toda vez que no se ha logrado reproducir el efecto del hPL sobre las MSC al

mezclar estas proteínas a las concentraciones a las que se encuentran en el hPL (Chieregato, et al., 2011, Fekete, et al., 2012a).

Nuestros resultados presentan algunas similitudes y diferencias con lo previamente reportado. Mientras que en reportes previos se han encontrado altas concentraciones de IFG-1, VEGF y endostatina, nosotros encontramos muy bajas concentraciones de estas proteínas en los dos lotes de hPL producidos (Crespo-Diaz, et al., 2011, Fekete, et al., 2012a). No obstante, encontramos al igual que otros grupos (Crespo-Diaz, et al., 2011, Fekete, et al., 2012a), altas concentraciones relativas de EGF, angiogenina, angiopoyetina1, G-CSF, MMP-9 y CXCL5 (Tab. 4.2).

No es sorprendente la ausencia del IGF en nuestros preparados. IGF es esencialmente una proteína del plasma sanguíneo (Le Roith, 2003), el cual es excluido de nuestros preparados, y por su parte los gránulos alfa de las plaquetas presentan una escasa cantidad de la proteína (Karey, et al., 1989).

De otra parte, la ausencia de VEGF y endostatina podría explicarse por la sensibilidad del método de detección usado por nosotros, una variación de la eficiencia de lisis para algunas subpoblaciones de gránulos alfa plaquetarios (Italiano, et al., 2008) o la liberación de algunas de estas subpoblaciones de gránulos plaquetarios por parte de las plaquetas durante el proceso de lavado (Doucet, et al., 2005).

### 5.3. PRODUCCIÓN XENO-FREE DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO

La dificultad para producir hASC seguras para seres humanos y de características consistentes, ha sido uno de los factores que ha dificultado su evaluación terapéutica en seres humanos. Incluso, el rechazo inmunológico a elementos derivados del FBS podría ser uno de los factores relacionados con el escaso beneficio que las MSC han demostrado en algunos ensayos clínicos (Squillaro, et al., 2015).

Usando el hPL producido con nuestro protocolo, fue posible extraer hASC a partir de explantes de tejido adiposo abdominal. Ya se ha reportado la extracción de estas células utilizando la técnica de explante (Beltran, 2007, Jing, et al., 2011, Linero, et al., 2014b). No obstante, nosotros demostramos que esta técnica también es eficaz cultivando los explantes de tejido adiposo en medio suplementado con hPL, lo cual además se correlacionó con la mayor velocidad de proliferación celular a partir de los explantes, en comparación con lo evidenciado en aquellos cultivados en medio suplementado con FBS (Fig. 4.6).

Ya se han reportado protocolos para la producción xeno-free de BMSCs usando hPL (Warnke, et al., 2013), pero no existen reportes de alternativas para la producción xeno-free de ASCs. El hPL ha probado ser un adecuado sustituto del FBS (Bieback, et al., 2009). Garantiza la estabilidad genómica de las MSC (Trojahn Kolle, et al., 2013), induce una mayor proliferación celular que el FBS (Doucet, et al., 2005, Schallmoser, et al., 2007), conserva las características de las MSC (incluyendo su seguridad en modelos de

inmunosupresión, (Schallmoser, et al., 2007)); además de que retrasa el aumento del tamaño y el desarrollo de senescencia celular (incluso revertirla) habitualmente relacionadas con el pase de las MSC cultivadas en medios suplementados con FBS (Griffiths, et al., 2013).

Aunque en nuestro trabajo nosotros no evaluamos la estabilidad genómica de las hASC cultivadas en medios suplementados con hPL, si encontramos una significativa mayor proliferación de ellas, a partir del segundo día. Las células cultivadas en medio suplementado con hPL completaron 3.24 doblajes poblacionales con un tiempo promedio de 2.16 días, mientras que aquellas cultivadas en medios suplementados con FBS solo completaron 1.26 doblajes con un tiempo promedio de 5.65 días (Fig. 4.6), datos que concuerdan con los reportes previos (Schallmoser, et al., 2007), aunque presentan diferencias con algunos reportes que pueden estar relacionadas con los cambios en el método de producción del hPL y extracción de las células (Trojahn Kolle, et al., 2013).

Se ha sugerido que las moléculas de la superfamilia de los factores de crecimiento con dominio de “nudo de cisteínas”, de la que hace parte PDGF-BB, regulan la proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales induciendo la actividad de la vía Wnt (Watabe, et al., 2009), y activando el sistema Jak2 (Levy, et al., 2008). Ya se ha demostrado que las hASC expresan receptores para factores de crecimiento como PDGF-BB, bFGF, TGF $\beta$  e IGF-1, lo cual se ha considerado como la demostración de que la capacidad funcional de estos factores guarda relación con el efecto fenotípico del hPL sobre las hASC.



Ya se ha reportado que las poblaciones de MSC cultivadas en medios suplementados con hPL están compuestas por células de menor tamaño y más homogéneo, que aquellas poblaciones de MSC cultivadas en medios suplementados con FBS (Doucet, et al., 2005, Griffiths, et al., 2013). Nosotros no evaluamos directamente estas dos variables, sin embargo si evidenciamos indirectamente sus diferencias en las dos condiciones de cultivo. A la misma confluencia celular, cada unidad de superficie de crecimiento celular fue ocupada por cerca del doble de células cuando estas fueron cultivadas bajo condiciones xeno-free, frente a aquellas cultivadas bajo condiciones estándar. Lo anterior podría deberse a que las células cultivadas en medios suplementados con hPL tengan cerca de la mitad del tamaño de aquellas cultivadas en condiciones estándar (Fig. 4.15), como ya ha sido reportado (Schallmoser, et al., 2007, Trojahn Kolle, et al., 2013).

### 5.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HASC, PRODUCIDAS BAJO CONDICIONES XENO-FREE

El hPL también ha demostrado tener la capacidad de preservar el potencial de diferenciación de las MSC, al igual que el patrón característico de expresión de sus marcadores de superficie (Griffiths, et al., 2013, Jonsdottir-Buch, et al., 2013).

Nosotros demostramos que las células extraídas mediante explante y cultivadas en medios suplementados con hPL, conservan la expresión característica de marcadores usualmente utilizados para su identificación (Figs. 4.7 y 4.8). Más del 95% de las células cultivadas en medio suplementado con hPL expresaron marcadores habitualmente positivos (CD73, CD90 y CD105), proporción que se redujo en las células cultivadas con

FBS (incluso al 91%, CD105), lo cual ya había sido reportado (McIntosh, et al., 2006, Mitchell, et al., 2006).

Aunque las hASC xeno-free demostraron poseer potencial de diferenciación adipogénico y osteogénico, se encontraron diferencias significativas en su capacidad de diferenciación hacia estos dos linajes celulares, en comparación con las células producidas en condiciones estándar (Figs. 4.9-4.12).

Confirmando los hallazgos de Chevallier N, et al. 2010 (Chevallier, et al., 2010) y van den Dolder J, et al (van den Dolder, et al., 2006), nosotros documentamos mayor potencial de diferenciación osteogénica y menor potencial de diferenciación adipogénico de las hASC cultivadas en medios suplementados con hPL (Figs. 4.11 y 4.12).

Ya se ha sugerido que este resultado es consecuencia del efecto ostoinductor probado de factores como TGF- $\beta$ , bFGF e IGF-1 detectados en diferentes preparaciones de hPL, incluyendo las nuestras. Las modificaciones implementadas por nosotros al protocolo habitualmente utilizado para la producción del hPL, podrían cambiar su composición (Weibrich, et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el aumento del potencial de diferenciación osteogénica de las células cultivadas en estas condiciones, pueda tener relación con la capacidad funcional de TGF- $\beta$  y bFGF, teniendo en cuenta la ausencia de IGF-1 en nuestras preparaciones (ya se ha sugerido que la actividad de la ruta de PDGF-BB no está relacionada con este fenómeno) (Kumar, et al., 2010)).

El menor potencial de diferenciación adipogénico de las hASC cultivadas en medio suplementado con hPL ya había sido sugerido por el menor tamaño de los depósitos de lípidos intracelulares desarrollados por ellas (Warnke, et al., 2013), pero esa diferencia no había sido cuantificada. Nosotros documentamos que las hASC cultivadas en medios de cultivo suplementados con hPL poseen una capacidad significativamente inferior ( $p = 0,003$ ) de diferenciación adipogénica, que las células cultivadas en medios suplementados con FBS.

El efecto del hPL sobre el potencial de diferenciación de las hASC podría explicarse por la probada capacidad osteoinductora de algunos de los factores presentes en él y la mutua exclusión que existe entre los programas transcripcionales de diferenciación osteogénica y adipogénica (Jaiswal, et al., 2000, Kim, et al., 2012).

La criopreservación es un paso indispensable para darle viabilidad a las MSC como alternativa terapéutica, toda vez que su cultivo requiere un tiempo que pocas veces puede coordinarse con el momento de su aplicación. Esta técnica se fundamenta en el uso de suplementos (tradicionalmente se ha usado el FBS) con agentes criopreservantes como el DMSO o el glicerol. La demostración de que el hPL producido con nuestro protocolo puede ser usado como base para la solución de criopreservación de las hASC, completa un proceso secuencial, ordenado y potencialmente escalable, para la producción xeno-free de hASC.

## 5.4. CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA, CUANTITATIVA Y FUNCIONAL DEL SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE DE LAS hASC PRODUCIDAS BAJO CONDICIONES XENO-FREE

### 5.4.1. CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Caracterizar cualitativa, cuantitativa y funcionalmente el secretoma neovascularizante de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free es una importante manera de evaluar la capacidad de inducir la regeneración tisular por parte de estas células, considerando la cada vez más abundante evidencia que vincula el secretoma neovascularizante de las MSC, con su capacidad regenerativa.

Se ha podido comprobar que la capacidad de inducción de regeneración tisular de las MSC, depende al menos en parte, de la inducción de angiogénesis y arteriogénesis mediante activación paracrina de células endoteliales, células de músculo liso vascular, además de la activación de células madre tisulares locales y modulación inmune en el tejido afectado (Gnecchi, et al., 2008, Kinnaird, et al., 2004b).

Existen diferentes reportes previos de la caracterización cuantitativa del secretoma neovascularizante de las hASC, incluyendo trabajos desarrollados por nuestro grupo (Hsiao, et al., 2012, Restrepo-Jimenez, 2009).

Los MCs estudiados por nosotros, tuvieron concentraciones detectables de los 43 factores evaluados con el arreglo de anticuerpos.

TIMP-1 y 2 son dos inhibidores endógenos de las metaloproteinasas de la matriz, enzimas indispensables para el correcto desarrollo de la neovascularización. TIMP-1 es un inhibidor de actividad sobre las MMP (Brew, et al., 2010). TIMP-1 es un inhibidor débil de las MMP-14, 16, 19 y 24; mientras que TIMP-2 tiene fuerte capacidad inhibitoria sobre todas las metaloproteinasas descritas hasta la fecha, pero además se ha reportado que tiene un dominio con capacidad de inhibir la proliferación y migración de células endoteliales (Kim, et al., 2014).

La IL-6 es reconocida como una citoquina pleiotrópica involucrada en la regulación de la respuesta inmune, hematopoyesis, inflamación, supervivencia celular, apoptosis y proliferación celular. Aunque tradicionalmente ha sido reconocida como una proteína de efecto proinflamatorio, ya se reportado su capacidad inmunomodulatoria que depende de diferentes efectos incluyendo el estímulo a células T CD8<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, inhibición de la diferenciación de células T<sub>H</sub>1, la polarización hacia fenotipos anti-inflamatorios de las células T<sub>H</sub>2 (Janssens, et al., 2015) y la polarización de monocitos hacia macrófagos M2 inmunomodulatorios (Eggenhofer, et al., 2012). También se ha reportado que esta citoquina induce la proliferación y migración de células endoteliales y diferenciación de precursores hemangioblásticos (Middleton, et al., 2014), lo cual explica por qué se reconoce que la secreción de IL-6 por parte de las MSC, es una de las razones que le otorga capacidad inmunomodulatoria y proangiogénica a estas células (Kyurkchiev, et al., 2014).

Nuestros datos, guardan relación, en algunos aspectos, con los previamente reportados. Al igual que nosotros, Hsiao y cols (2012) (Hsiao, et al., 2012) encontraron altas concentraciones de CXCL1-3 (GRO) e IL-6 en los MC-S de las hASC, sin embargo nosotros no detectamos altas concentraciones de Angiogenina, mientras que Hsiao y cols (2012), no detectaron altas concentraciones MCP-1 y angiostatina.

De otra parte, en los MCs estudiados por Restrepo y colaboradores (2009) (Restrepo-Jimenez, 2009), las proteínas de más alta concentración fueron TIMP-1, IL-2, TIMP-2, CCL-5 (RANTES), IL-4 y CXCL1-3 (GRO), mientras que no tuvieron concentraciones cuantificables de Angiogenina, Angiopoietina 1, Endostatina y G-CSF. Estos datos difieren de los nuestros en que nosotros detectamos concentraciones cuantificables, de todas las proteínas estudiadas con el arreglo de anticuerpos, además de que no encontramos altas concentraciones de IL-2, IL-4 y CCL-5.

Estas diferencias pueden tener relación con el método de extracción de las células (en el trabajo de Hsiao y cols se usó colagenasa para la extracción de las hASCs), con el pase celular al cual se evaluó el secretoma y con el procedimiento para obtener el medio condicionado.

Se ha reportado que los suplementos nutricionales y la superficie de cultivo modifican el secretoma de las MSC (Madrigal, et al., 2014). Se ha sugerido que el cultivo en medios suplementados con hPL induce el aumento de la liberación de VEGF por parte de las hASC de segundo pase (Trojahn Kolle, et al., 2013), sin embargo, nosotros evidenciamos ese

efecto solo hasta séptimo pase (Fig. 4.19). La diferencia con los reportes previos puede deberse a varios factores, incluyendo las diferencias en los protocolos de producción del hPL (cambios en la concentración de diferentes proteínas incluyendo fibrinógeno e IGF-1 y la ausencia de heparina en el medio de cultivo), las diferencias en los protocolos de recolección del MC (Clabaut, et al., 2015) y los pases celulares a los cuales nosotros trabajamos.

Sin embargo, vale la pena resaltar que las diferencias encontradas por Trojahn Kølle, y colaboradores (Trojahn Kalle, et al., 2013), no son significativas y solo las detectaron en la mitad de las muestras estudiadas por ellos. Nosotros hicimos una amplia caracterización cuantitativa y funcional del secretoma de las hASC en dos muestras diferentes, encontrando cambios reproducidos en ambas muestras.

De otra parte, debe reconocerse que nuestros datos solo describen los cambios sufridos por algunas de las proteínas de efecto neovascularizante secretadas por las hASC, aunque se ha sugerido también que las MSC secretan una amplia variedad de especies moleculares incluyendo, por ejemplo, ácidos nucleicos (Baglio, et al., 2015, Gallina, et al., 2015), y lípidos (Tomasoni, et al., 2013) con claras implicaciones funcionales sobre la regulación de la neovascularización (Bara, et al., 2015, Gallina, et al., 2015).

Nuestros datos sugieren que los efectos de la producción xeno-free son modificados por el pase celular. Solo la secreción de PDGF-BB e IFN- $\gamma$  se aumentó en ambos pases celulares, en respuesta al cultivo bajo condiciones xeno-free (Tab. 5.1 y Figs. 4.16 y 4.19), mientras

que la secreción de EGF, Leptina, CCL-1, CCL-5, CCL-7, GM-CSF, G-CSF, CXCL-11 se aumentó en cuarto pase (Fig. 4.16) y la de CXCL-5, IGF-1, y VEGF, se aumentó en séptimo pase (Fig. 4.19).

Ya se ha mencionado que IFN- $\gamma$  (detectado en el hPL y aumentado en el secretoma de las hASC xeno-free) es un reconocido inductor de quimioquinas CXC anti-neovascularizantes mientras que IL-1 y el FNT- $\alpha$  (detectados en el hPL) inducen la producción de quimioquinas pro-neovascularizantes, lo cual explica el aumento de CXCL11 y CXCL5, en el secretoma de las hASC producidas bajo condiciones xeno-free, de cuarto y séptimo pase respectivamente (Tab 5.1).

En el 2012, Carrero R, y colaboradores (Carrero, et al., 2012) demostraron que el estímulo con IL-1 $\beta$  indujo modificaciones sustanciales en el funcionamiento de las MSC (incluyendo el secretoma). En este trabajo se evidenció el aumento de la actividad transcripcional de sistemas relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria, regulación negativa de apoptosis, adhesión celular y respuesta a heridas, entre otros.

La presencia de factores proinflamatorios como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en nuestras preparaciones de hPL, podría explicar el aumento de la secreción de GM-CSF, o quimioquinas como las de la familia CC (CCL1, CCL5 y CCL7) o de tipo CXC (CXCL5 y CXCL11).



**Tabla 5.1. Consolidado de las variaciones detectadas en el secretoma neovascularizante de las hASC de cuarto y séptimo pase celular, producidas bajo condiciones xeno-free frente a las hASC producidas bajo condiciones estándar**

Variación	hASC xeno-free de Cuarto pase	hASC xeno-free de séptimo pase	hASC xeno-free de séptimo pase vs hASC xeno-free de cuarto pase	hASC estándar de séptimo pase vs hASC estándar de cuarto pase
Aumento	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PDGF-BB</li> <li>- IFN-<math>\gamma</math></li> <li>- EGF</li> <li>- Leptina</li> <li>- CCL-1, 5 y 7</li> <li>- CXCL-11</li> <li>- GM-CSF y G-CSF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PDGF-BB</li> <li>- IFN-<math>\gamma</math></li> <li>- CXCL-5</li> <li>- IGF-1</li> <li>- VEGF A</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CXCL5</li> <li>- THPO</li> <li>- VEGFA y D</li> <li>- VEGFR3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CCL-1 y 5</li> <li>- TIMP-2</li> <li>- Angiopoyetina 1</li> <li>- PLG</li> <li>- IL-2</li> <li>- CXCL-11</li> <li>- MMP-1 y 9</li> <li>- Tie-2</li> <li>- VEGFR3</li> <li>- uPAR</li> </ul>
Reducción	<ul style="list-style-type: none"> <li>- MCP-1 y 4</li> <li>- Angiogenina</li> <li>- IL-2, 6 y 8</li> <li>- IGF-1</li> <li>- TIMP-1 y 2</li> <li>- VEGF A y D</li> <li>- Angiopoyetina 1 y 2</li> <li>- MMP-1 y 9</li> <li>- PECAM-1</li> <li>- CXCL-5</li> <li>- Tie-2</li> <li>- VEGFR2 y 3</li> <li>- uPAR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- EGF</li> <li>- Angiogenins</li> <li>- PDGF-BB</li> <li>- MCP-1 y 4</li> <li>- IL-2, 4, 6, 8 y 10</li> <li>- IGF-1</li> <li>- IFN-<math>\gamma</math></li> <li>- CCL7</li> <li>- CXCL-1, 2, 3, 5 y 11</li> <li>- TIMP-1 y 2</li> <li>- Trombopoyetina</li> <li>- VEGF-A y D</li> <li>- Angiopoyetina 1 y 2</li> <li>- GM-CSF y G-CSF</li> <li>- MMP-1 y 9</li> <li>- PECAM-1</li> <li>- Tie-2</li> <li>- TNF-<math>\alpha</math></li> <li>- VEGFR-2 y 3</li> <li>- uPAR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- EGF</li> <li>- Angiogenina</li> <li>- bFGF</li> <li>- PDGF-BB</li> <li>- MCP-1</li> <li>- Leptina</li> <li>- IL-1<math>\alpha</math>, 4, 6 y 10</li> <li>- IFN-<math>\gamma</math></li> <li>- CCL1, 5 y 7</li> <li>- CXCL-1, 3 y 11</li> <li>- Trombopoyetina</li> <li>- Angiopoyetina 1 y 2</li> <li>- PLG</li> <li>- GM-CSF y G-CSF</li> <li>- CCL-7</li> <li>- MMP-9</li> <li>- PECAM-1</li> <li>- Tie-2</li> <li>- TNF-<math>\alpha</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PDGF-<math>\beta</math></li> <li>- CXCL-1, 2 y 3</li> <li>- VEGF-A y D</li> <li>- Angiopoyetina 2</li> <li>- Il-6 and 8</li> <li>- IFN-<math>\gamma</math></li> <li>- PlGF</li> <li>- PECAM-1</li> </ul>

Se sabe que las quimioquinas de la familia CC inducen la quimiotaxis de monocitos y células T, mientras que las de la familia CXC inducen la quimiotaxis de neutrófilos. Evidentemente, este perfil paracrino sugiere que el cultivo en hPL estimula la capacidad inmuno-moduladora de las MSC, lo cual podría correlacionarse con una mejor capacidad

de inducción de regeneración tisular (Carrero, et al., 2012), además del aumento de la capacidad pro-neovascularizante por la presencia de quimioquinas CXC ELR+ como CXCL5 (Belperio, et al., 2000), y quimioquinas de la familia CC con capacidad pro-neovascularizante como CCL1, CCL5 y CCL7 (Keeley, et al., 2008, Keeley, et al., 2011).

No obstante, nuestros resultados difieren en algunos aspectos de los presentados por Carrero, R y colaboradores. Nosotros no evidenciamos el aumento de la secreción de factores como CXC1-3 (GRO), CXCL8 (IL-8), CCL-1 (MCP-1), TNF $\alpha$ , MMP1, lo cual podría explicarse por el efecto agregado de todos los factores incluidos en el hPL, además de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ .

Al comparar cuantitativamente el secretoma neovascularizante de las hASC de cuarto y séptimo pase, pudimos documentar diferencias significativas asociadas al pase celular en ambas condiciones de producción. Mientras que en condiciones xeno-free se evidenció aumento en la secreción de VEGFA y D, además de THPO, CXCL-5 y la forma soluble de VEGFR3, en condiciones estándar de producción, se aumentó la secreción de algunas proteínas pro-neovascularizantes como CCL-5, Angiopoyetina 1, IL-2 y las metaloproteinasas 1 y 2.

Como efecto del pase bajo condiciones estándar de producción, llama la atención el aumento de secreción de factores anti-neovascularizantes como el inhibidor de metaloproteinasas TIMP-2, angiostatina (PIG), CXCL11, y las formas solubles de los receptores de angiopoyetina (Tie-2) y VEGF (VEGFR3) (Fig. 4.22B). Mientras que bajo

condiciones xeno-free se evidenció el aumento de la secreción de factores con capacidad proneovascularizante y la disminución de la secreción de todos los factores antineovascularizantes (Fig. 4.22A). Estas diferencias, podrían explicar las diferencias significativas evidenciadas en las pruebas funcionales con estos MCs.

El análisis bioinformático de los resultados del arreglo de anticuerpos, es una importante herramienta para comprender las modificaciones funcionales inducidas por la producción de las MSC bajo condiciones xeno-free.

No obstante, debe reconocerse que estos resultados solo consideran algunas de las proteínas que hacen parte del secretoma de las hASC. Además de otras tantas proteínas que no están involucradas con la regulación de la neovascularización, nuestros datos dejan de lado especies moleculares como ácidos nucleicos (Baglio, et al., 2015, Bara, et al., 2015, Gallina, et al., 2015) y lípidos (Tomasoni, et al., 2013) que hacen parte del secretoma de estas células y su estudio lógicamente brindaría información más amplia respecto a la capacidad regenerativa de las MSC y su condición funcional.

En la tabla 5.2 se presenta el consolidado de los resultados de los análisis bio-informáticos de los efectos de la producción xeno-free y el pase celular, sobre el secretoma neovascularizante de las hASC. Estos análisis sugieren que las células de cuarto pase producidas en condiciones xeno-free, presentarían aumento de actividad de mayor actividad de la vía molecular Jak/STAT, los sistemas de receptores para citoquinas y quimioquinas y los procesos de regulación de importación proteica al núcleo (Fig. 4.17).

De otra parte, tendrían reprimida la vía molecular de la kinasa de fosfatidil-inositol 3 (*Phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), la actividad de sistemas de kinasas de tirosina, la actividad de la vía de señalización de VEGF y los procesos moleculares relacionados con la inducción de la migración de células de músculo liso y leucocitos (Fig. 4.18).

La vía de Jak/STAT ha sido relacionada con la proliferación y diferenciación osteogénica de las MSC (Joung, et al., 2012), lo cual podría asociarse con el aumento del potencial de diferenciación osteogénico identificado en las hASC producidas en condiciones xeno-free. La actividad de la vía JAK2-STAT3 ha sido asociada de manera directa con la supervivencia y eficacia terapéutica de las MSC trasplantadas en un modelo animal de infarto agudo de miocardio (Xu, et al., 2011). Este vía molecular es indispensable en la preservación fenotípica de las células madre embrionarias de ratón, lo cual se implementa en la producción de células pluripotenciales inducidas, utilizando el factor inhibidor de leucemias (*Leukemia Inhibitory Factor*, LIF) (Tang, et al., 2013).

No son claras las implicaciones que podría tener el aumento de la actividad de los sistemas de receptores de citoquinas y quimioquinas, sobre el funcionamiento de las MSC, toda vez que este tipo de proteínas han sido consideradas tradicionalmente como moléculas de señalización producidas en respuesta a estímulos nocivos, y se ha planteado que el rol fisiológico de estas células es regular la correcta respuesta a estímulos nocivos favoreciendo así la correcta regeneración tisular (Caplan, et al., 2015).

Se ha sugerido que las MSC (Caplan, et al., 2015) y las plaquetas (gracias al contenido de sus gránulos) (Zufferey, et al., 2012), hacen parte del sistema tisular de respuesta a estímulos nocivos, regulando la respuesta inflamatoria y activando los procesos relacionados con la regeneración tisular, incluyendo la neovascularización, migración y proliferación de células madre locales. Es muy amplia la cantidad de citoquinas y quimioquinas que se encuentran en el interior de los gránulos plaquetarios, lo cual explicaría el hecho de que los sistemas regulatorios de los receptores para este tipo de moléculas, se encuentren activos en las MSC cultivadas en el hPL.

**Tabla 5.2. Consolidado de los análisis bioinformáticos del efecto de la producción xeno-free y el pase celular sobre el secretoma neovascularizante de las hASC**

Variación	Cuarto pase hPL vs FBS	Séptimo pase hPL vs FBS	FBS séptimo pase vs cuarto pase
Aumento	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jak/STAT</li> <li>- Receptores de citoquinas y quimioquinas</li> <li>- Importación proteica al núcleo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Señalización intracelular de VEGF</li> <li>- Señalización intracelular de IGF1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actividad del receptor de IL2</li> <li>- Vía de señalización mediada por quimioquinas.</li> <li>- Regulación de la migración de células epiteliales.</li> <li>- Fibrinólisis</li> </ul>
Disminución	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PI3K, tirosin kinasas, señalización de VEGF, migración de células de músculo liso y leucocitos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Regulación de quimiotaxis y migración celular, especialmente la de leucocitos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Regulación positiva de la vía de ERK</li> <li>- Regulación de quimiotaxis</li> <li>- Regulación de las interacción de citoquinas con su receptor</li> </ul>

La vía de PI3K es uno de los principales sistemas de transducción de señales intracelulares. Ha sido relacionada con la regulación de la diferenciación adipogénica de las MSC (Song, et al., 2015), lo cual podría explicar la reducción significativa del potencial de diferenciación de las hASC producidas en condiciones xeno-free.

El análisis bio-informático del secretoma de las hASC de séptimo pase producidas en condiciones estándar, evidenció que estas células tendrían mayor actividad de vías moleculares de señalización de IL2, fibrinólisis, quimiotaxis y migración celular la actividad de quimioquinas (Fig. 26); y menor actividad de la vía molecular de ERK, regulación de la quimiotaxis, la interacción de citoquinas con sus receptores (Fig. 4.21).

#### 5.4.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS MCs

La capacidad funcional del secretoma de las hASC ha sido relacionada, al menos en parte, con la actividad de factores tróficos que regulan procesos como la modulación metabólica y citoprotección de las células expuestas al daño (Gnecchi, et al., 2005), además de la modificación de la matriz extracelular gracias a la producción de metaloproteinasas, inmunomodulación y estímulo a las células madre locales (Hatzistergos, et al., 2010).

El grupo de pruebas funcionales practicadas por nosotros, brinda información importante respecto a la capacidad neovascularizante de los MCs evaluados. Cada prueba evalúa un grupo diferente de variables involucradas en la regulación de la angiogénesis, arteriogénesis y vasculogénesis, y sus resultados se complementan entre sí, toda vez que evalúan procesos diferentes, todos ellos requeridos para el adecuado estudio preclínico de la capacidad neovascularizante.

El modelo de matrigel permite evaluar la capacidad de inducir la proliferación, migración y organización de células endoteliales, procesos indispensables en el desarrollo de la angiogénesis. Por su parte, el modelo ex vivo de anillos de aorta murina, es un sistema en

el cual se incluye la participación de células de músculo liso vascular y puede evidenciarse la formación de estructuras tubulares, lo cual no se logra en el ensayo in vitro. Finalmente, con el modelo in vivo se evalúa la capacidad neovascularizante de los MCs, en un sistema en el cual se incluyen la participación del sistema inmune, células madre tisulares (incluyendo las derivadas de tejido adiposo murino) y variables hemodinámicas (muy importantes en la arteriogénesis).

Reportes previos, sugieren que factores como las condiciones de cultivo (Madrigal, et al., 2014) y el contacto intercelular (Reikvam, et al., 2015) modifican la capacidad funcional del secretoma de las MSC. Nuestros resultados, confirman esta evidencia y sugieren que tanto la producción xeno-free como el pase celular modifican la capacidad funcional del secretoma neovascularizante de las hASC.

En cuarto pase celular, la producción xeno-free se asoció con la reducción significativa en la capacidad de formar nodos (p muestra A= 0.006; p muestra B= 0.01) y uniones maestras (p muestra A= 0.09; p muestra B= 0.00423) (Fig. 4.27). Sin embargo, la producción xeno-free hasta séptimo pase, se asoció con aumento significativo de la capacidad neovascularizante de los MCs evaluados. Este resultado lo sugiere el aumento significativo de la cantidad de nodos (Fig. 4.28, p de la muestra A=0.018; p de la muestra B=0.011), uniones (Fig. 4.29, p de la muestra A= 0.007; p de la muestra B = 0.011), uniones maestras (Fig. 4.30, p de la muestra A= 0.012; p de la muestra B= 0.000) y segmentos maestros (Fig. 4.31, p de la muestra A= 0.034; p de la muestra B= 0.007), formadas por las células endoteliales cultivadas en los MC-hPL respecto a los MC-FBS.

Por su parte, el pase celular se asoció con una reducción significativa en la capacidad funcional de los MC-FBSs mientras que bajo condiciones xeno-free de producción, no se evidenció una diferencia funcional significativa asociada a la producción xeno-free (Figs. 4.32-4.36).

Solo se conoce un reporte donde se evalúa la capacidad neovascularizante de las hASC cultivadas en medios suplementados con hPL. Trojahn Kølle, y colaboradores (Trojahn Kolle, et al., 2013) reportaron no haber encontrado impacto funcional del cultivo en medios suplementados con hPL, sobre la capacidad angiogénica de estas células. La diferencia con nuestros resultados puede ser resultado de las diferencias en el protocolo de producción del hPL, el efecto de la extracción y cultivo con hPL, la edad de los donantes de las muestras a partir de las cuales se extrajeron las células o una combinación de estos factores.

De otra parte, los ensayos ex vivo con anillos de aorta murina evidenciaron que la producción xeno-free (en ambos pases celulares) se asoció con el aumento significativo de la capacidad angiogénica de los MCs evaluados. La cantidad de brotes angiogénicos fue formados a partir de los anillos de aorta murina, fue significativamente superior al cultivarlos en MC-hPL de ambos pases, además de que la longitud y cantidad de ramas de los brotes fue significativamente superior como consecuencia de la producción xeno-free hasta séptimo pase celular.



La liofilización o secado por congelación, es una técnica muy usada para aumentar la estabilidad de moléculas, especialmente aquellas de naturaleza proteica (Tang, et al., 2004), con miras a su almacenamiento por largos períodos de tiempo. Esta técnica se fundamenta en la extracción del solvente (usualmente agua) de un compuesto, mediante sublimación. Se parte de la congelación del compuesto, para posteriormente exponer el compuesto a una presión por debajo de la presión de vapor del hielo, de forma que el agua sea extraída del compuesto congelado.

La liofilización ha sido una técnica muy usada para la preservación de compuestos de naturaleza proteica, incluyendo el plasma rico en plaquetas (Pietramaggiore, et al., 2006, Pietramaggiore, et al., 2008). Ya se ha reportado la comparación cuantitativa y funcional de MCs de MSC antes y después de ser liofilizados (Eiro, et al., 2014, Peng, et al., 2015). Al igual que en nuestros ensayos, se ha demostrado la reducción en la detección de las proteínas presentes en estos MCs después de ser resuspendidas. Sin embargo, nosotros encontramos algunos factores, que aumentaron su detección después de la liofilización, lo cual podría tener relación con la técnica utilizada para su detección, con las características del protocolo de liofilización implementado por nosotros o con una combinación de estos factores.

Los ensayos in vivo evidenciaron que los MCs de las hASC tienen capacidad neovascularizante, lo cual ya había sido reportado previamente con MSC de diferentes orígenes, incluyendo médula ósea (Martins, et al., 2014) y tejido adiposo (Moon, et al., 2006). Además, nuestros ensayos sugieren que las hASC producidas bajo condiciones

xeno-free poseen mejor capacidad neovascularizante en el modelo in vivo, considerando la diferencia que se documentó en la masa muscular de los animales tratados con MC-hPL frente a aquellos tratados con MC-FBS.

Los signos de atrofia detectados en los cortes histológicos de los ratones que integraron el grupo control negativo, sugieren que estos tejidos no se vieron expuestos a isquemia completa y si a isquemia parcial. No obstante, pensamos que nuestros resultados sugieren que los MC de las hASC xeno-free y estándar poseen capacidad neovascularizante por la diferencia funcional que se encontró (fuerza muscular), la diferencia en la masa de los músculos de los animales que integraron los grupos intervenidos (MC-Xf y MC-S) y los animales que integraron el grupo control negativo, además de la detección de características tisulares normales o la detección de signos aislados de atrofia muscular en las muestras musculares de los animales tratados y la evidencia de proliferación endotelial en la inmunohistoquímica contra CD31.

---

## 6. CONCLUSIONES

La minimización de los riesgos de efectos adversos asociados al uso de alternativas terapéuticas es uno de los principales objetivos de la comunidad asistencial. Las MSC son una atractiva alternativa terapéutica para el manejo de enfermedades caracterizadas por la pérdida aguda o crónica de tejidos y la regeneración de esos tejidos es uno de los principales objetivos para su manejo. En este trabajo documentamos un protocolo completo para la producción (extracción, cultivo y criopreservación) de hASC seguras para aplicar a seres humanos.

La capacidad de inducir la regeneración tisular que poseen las MSC, ha podido documentarse tanto en modelos clínicos como preclínicos. Esta capacidad ha sido relacionada, al menos en parte, con la capacidad funcional de su secretoma, el cual modula variados procesos indispensables para la correcta reestructuración de un tejido lesionado, incluyendo la neovascularización.

Nuestros resultados sugieren que tanto la producción xeno free como el pase celular modifican las características cuantitativas y funcionales del secretoma neovascularizante de las hASC. Las hASC producidas bajo condiciones xeno-free demostraron aumento de la capacidad funcional en el modelo ex vivo, pero no demostraron diferencias con las producidas bajo condiciones estándar, en el ensayo de matrigel.

El pase celular se asoció con la reducción significativa de la capacidad funcional de los MC-FBS, aunque no se encontró este resultado bajo condiciones xeno-free de producción. Lo

anterior sugiere que estas células conservarían su capacidad neovascularizante al menos hasta séptimo pase. Con fines terapéuticos podrían entonces ser cultivadas hasta séptimo pase celular, sin perder eficacia neovascularizante, lo cual permitiría obtener una mayor cantidad de células trasplantables.

---

## 7. RECOMENDACIONES

- Las hASC han demostrado tener capacidad de inducir la regeneración de diferentes tejidos incluyendo piel, hueso, miocardio y músculo esquelético. Es importante evaluar si la producción bajo condiciones xeno-free modifica esa capacidad.
- Nuestros resultados demuestran que las hASC producidas bajo condiciones xeno-free, poseen capacidad neovascularizante en modelos experimentales preclínicos. Debe evaluarse si ese resultado es evidenciable en seres humanos.

---

## 8. REFERENCIAS

(CHMP) CfMPFHU. GUIDELINE ON THE USE OF BOVINE SERUM IN THE MANUFACTURE OF HUMAN BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS. EUROPEAN MEDICINES AGENCY; 2013.

ABDEL-LATIF A, BOLLI R, TLEYJEH IM, ET AL. ADULT BONE MARROW-DERIVED CELLS FOR CARDIAC REPAIR: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. ARCH INTERN MED. 2007;167(10):989-997. EPUB 2007/05/30.

APPASANI K, APPASANI R. INTRODUCTION TO STEM CELLS AND REGENERATIVE MEDICINE. IN: APPASANI K, APPASANI RK, EDITORS. STEM CELLS & REGENERATIVE MEDICINE: HUMANA PRESS; 2011. P. 3-18.

ARANDA E, OWEN GI. A SEMI-QUANTITATIVE ASSAY TO SCREEN FOR ANGIOGENIC COMPOUNDS AND COMPOUNDS WITH ANGIOGENIC POTENTIAL USING THE EA.HY926 ENDOTHELIAL CELL LINE. BIOL RES. 2009;42(3):377-389. EPUB 2009/11/17.

AUST L, DEVLIN B, FOSTER SJ, ET AL. YIELD OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED ADULT STEM CELLS FROM LIPOSUCTION ASPIRATES. CYTOTHERAPY. 2004;6(1):7-14. EPUB 2004/02/27.

BAGLIO SR, ROOIJERS K, KOPPERS-LALIC D, ET AL. HUMAN BONE MARROW- AND ADIPOSE-MESENCHYMAL STEM CELLS SECRETE EXOSOMES ENRICHED IN DISTINCTIVE MIRNA AND tRNA SPECIES. STEM CELL RES THER. 2015;6:127. EPUB 2015/07/02.

BAKER M, ROBINSON SD, LECHERTIER T, ET AL. USE OF THE MOUSE AORTIC RING ASSAY TO STUDY ANGIOGENESIS. NAT PROTOC. 2012;7(1):89-104. EPUB 2011/12/24.

BAPTISTA LS, DO AMARAL RJ, CARIAS RB, ET AL. AN ALTERNATIVE METHOD FOR THE ISOLATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS DERIVED FROM LIPOASPIRATE SAMPLES. CYTOTHERAPY. 2009;11(6):706-715. EPUB 2009/11/03.

BARA JJ, TURNER S, ROBERTS S, ET AL. HIGH CONTENT AND HIGH THROUGHPUT SCREENING TO ASSESS THE ANGIOGENIC AND NEUROGENIC ACTIONS OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN VITRO. EXP CELL RES. 2015;333(1):93-104. EPUB 2015/02/14.

BARCELOS LS, TALVANI A, TEIXEIRA AS, ET AL. PRODUCTION AND IN VIVO EFFECTS OF CHEMOKINES CXCL1-3/KC AND CCL2/JE IN A MODEL OF INFLAMMATORY ANGIOGENESIS IN MICE. INFLAMM RES. 2004;53(10):576-584. EPUB 2004/12/15.

---

BEAMISH JA, HE P, KOTTKE-MARCHANT K, ET AL. MOLECULAR REGULATION OF CONTRACTILE SMOOTH MUSCLE CELL PHENOTYPE: IMPLICATIONS FOR VASCULAR TISSUE ENGINEERING. *TISSUE ENG PART B REV.* 2010;16(5):467-491. EPUB 2010/03/26.

BELPERIO JA, KEANE MP, ARENBERG DA, ET AL. CXC CHEMOKINES IN ANGIOGENESIS. *J LEUKOC BIOL.* 2000;68(1):1-8. EPUB 2000/07/29.

BELTRAN O. EXPRESIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO, EN CONDICIONES DE NORMOXIA E HIPOXIA: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA; 2007.

BERNARDINI G, SPINETTI G, RIBATTI D, ET AL. I-309 BINDS TO AND ACTIVATES ENDOTHELIAL CELL FUNCTIONS AND ACTS AS AN ANGIOGENIC MOLECULE IN VIVO. *BLOOD.* 2000;96(13):4039-4045. EPUB 2000/12/09.

BIANCO P, ROBEY PG, SIMMONS PJ. MESENCHYMAL STEM CELLS: REVISITING HISTORY, CONCEPTS, AND ASSAYS. *CELL STEM CELL.* 2008;2(4):313-319. EPUB 2008/04/10.

BIANCHI F, MAIOLI M, LEONARDI E, ET AL. A NEW NONENZYMATIC METHOD AND DEVICE TO OBTAIN A FAT TISSUE DERIVATIVE HIGHLY ENRICHED IN PERICYTE-LIKE ELEMENTS BY MILD MECHANICAL FORCES FROM HUMAN LIPOASPIRATES. *CELL TRANSPLANT.* 2013;22(11):2063-2077. EPUB 2012/10/12.

BIEBACK K, HECKER A, KOCAOMER A, ET AL. HUMAN ALTERNATIVES TO FETAL BOVINE SERUM FOR THE EXPANSION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM BONE MARROW. *STEM CELLS.* 2009;27(9):2331-2341. EPUB 2009/06/23.

BIEBACK K, KINZEBACH S, KARAGIANNI M. TRANSLATING RESEARCH INTO CLINICAL SCALE MANUFACTURING OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS. *STEM CELLS INT.* 2011;2010:1935-19. EPUB 2011/02/15.

BOBEK V, TALTYNOV O, PINTEROVA D, ET AL. GENE THERAPY OF THE ISCHEMIC LOWER LIMB--THERAPEUTIC ANGIOGENESIS. *VASCUL PHARMACOL.* 2006;44(6):395-405. EPUB 2006/05/16.

BOETTCHER M, GLOE T, DE WIT C. SEMIAUTOMATIC QUANTIFICATION OF ANGIOGENESIS. *J SURG RES.* 2010;162(1):132-139. EPUB 2009/04/07.

BOOMSMA RA, GEENEN DL. MESENCHYMAL STEM CELLS SECRETE MULTIPLE CYTOKINES THAT PROMOTE ANGIOGENESIS AND HAVE CONTRASTING EFFECTS ON CHEMOTAXIS AND APOPTOSIS. *PLOS ONE.* 2012;7(4):E35685. EPUB 2012/05/05.

---

BOUCHENTOUF M, WILLIAMS P, FORNER KA, ET AL. INTERLEUKIN-2 ENHANCES ANGIOGENESIS AND PRESERVES CARDIAC FUNCTION FOLLOWING MYOCARDIAL INFARCTION. CYTOKINE. 2011;56(3):732-738. EPUB 2011/10/19.

BOUDOULAS KD, HATZOPOULOS AK. CARDIAC REPAIR AND REGENERATION: THE RUBIK'S CUBE OF CELL THERAPY FOR HEART DISEASE. DIS MODEL MECH. 2009;2(7-8):344-358. EPUB 2009/06/26.

BREW K, NAGASE H. THE TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES (TIMPs): AN ANCIENT FAMILY WITH STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY. BIOCHIM BIOPHYS ACTA. 2010;1803(1):55-71. EPUB 2010/01/19.

BROWN P, WILL RG, BRADLEY R, ET AL. BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY AND VARIANT CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE: BACKGROUND, EVOLUTION, AND CURRENT CONCERNS. EMERG INFECT DIS. 2001;7(1):6-16. EPUB 2001/03/27.

BRUNNER D, FRANK J, APPL H, ET AL. SERUM-FREE CELL CULTURE: THE SERUM-FREE MEDIA INTERACTIVE ONLINE DATABASE. ALTEX. 2010;27(1):53-62. EPUB 2010/04/15.

CAI W, SCHAPER W. MECHANISMS OF ARTERIOGENESIS. ACTA BIOCHIM BIOPHYS SIN (SHANGHAI). 2008;40(8):681-692. EPUB 2008/08/08.

CANTINIEAUX D, QUERTAINMONT R, BLACHER S, ET AL. CONDITIONED MEDIUM FROM BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IMPROVES RECOVERY AFTER SPINAL CORD INJURY IN RATS: AN ORIGINAL STRATEGY TO AVOID CELL TRANSPLANTATION. PLOS ONE. 2013;8(8):E69515. EPUB 2013/09/10.

CAO Y, SUN Z, LIAO L, ET AL. HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS DIFFERENTIATE INTO ENDOTHELIAL CELLS IN VITRO AND IMPROVE POSTNATAL NEOVASCULARIZATION IN VIVO. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 2005;332(2):370-379. EPUB 2005/05/18.

CAPLAN AI. ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS FOR TISSUE ENGINEERING VERSUS REGENERATIVE MEDICINE. J CELL PHYSIOL. 2007;213(2):341-347. EPUB 2007/07/11.

CAPLAN AI, CORREA D. THE MSC: AN INJURY DRUGSTORE. CELL STEM CELL. 2011;9(1):11-15. EPUB 2011/07/06.

CAPLAN AI, DENNIS JE. MESENCHYMAL STEM CELLS AS TROPHIC MEDIATORS. J CELL BIOCHEM. 2006;98(5):1076-1084. EPUB 2006/04/19.

CAPLAN AI, SORRELL JM. THE MSC CURTAIN THAT STOPS THE IMMUNE SYSTEM. IMMUNOL LETT. 2015. EPUB 2015/06/17.

---

PRODUCCIÓN XENO-FREE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO Y  
EVALUACIÓN DE SU SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE



---

CARMELET P. ANGIOGENESIS IN HEALTH AND DISEASE. NAT MED. 2003;9(6):653-660. EPUB 2003/06/05.

CARPENTER G. CONTRIBUTION: ANGIOGENESIS ANALYZER. IMAGEJ NEWS [INTERNET]. 2012.

CARPENTIER G. ANGIOGENESIS ANALYZER FOR IMAGEJ. 2012 [CITED 2015 22 - VII - 2015]; AVAILABLE FROM: [HTTP://IMAGE.BIO.METHODS.FREE.FR/IMAGEJ/?ANGIOGENESIS-ANALYZER-FOR-IMAGEJ&LANG=EN](http://image.bio.methods.free.fr/imagej/?angiogenesis-analyzer-for-imagej&lang=en).

CARRERO R, CERRADA I, LLEDO E, ET AL. IL1BETA INDUCES MESENCHYMAL STEM CELLS MIGRATION AND LEUCOCYTE CHEMOTAXIS THROUGH NF-KAPPAB. STEM CELL REV. 2012;8(3):905-916. EPUB 2012/04/03.

CLABAUT A, GRARE C, LEGER T, ET AL. VARIATIONS OF SECRETOME PROFILES ACCORDING TO CONDITIONED MEDIUM PREPARATION: THE EXAMPLE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL-DERIVED ADIPOCYTES. ELECTROPHORESIS. 2015;36(20):2587-2593. EPUB 2015/06/25.

CRESPO-DIAZ R, BEHFAR A, BUTLER GW, ET AL. PLATELET LYSATE CONSISTING OF A NATURAL REPAIR PROTEOME SUPPORTS HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL PROLIFERATION AND CHROMOSOMAL STABILITY. CELL TRANSPLANT. 2011;20(6):797-811. EPUB 2010/11/26.

CRISAN M, YAP S, CASTEILLA L, ET AL. A PERIVASCULAR ORIGIN FOR MESENCHYMAL STEM CELLS IN MULTIPLE HUMAN ORGANS. CELL STEM CELL. 2008;3(3):301-313. EPUB 2008/09/13.

CROSS MJ, CLAESSON-WELSH L. FGF AND VEGF FUNCTION IN ANGIOGENESIS: SIGNALLING PATHWAYS, BIOLOGICAL RESPONSES AND THERAPEUTIC INHIBITION. TRENDS PHARMACOL SCI. 2001;22(4):201-207. EPUB 2001/04/03.

CHANG KA, LEE JH, SUH YH. THERAPEUTIC POTENTIAL OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS IN NEUROLOGICAL DISORDERS. J PHARMACOL SCI. 2014. EPUB 2014/11/21.

CHEN FH, TUAN RS. MESENCHYMAL STEM CELLS IN ARTHRITIC DISEASES. ARTHRITIS RES THER. 2008;10(5):223. EPUB 2008/10/25.

CHEVALLIER N, ANAGOSTOU F, ZILBER S, ET AL. OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS WITH PLATELET LYSATE. BIOMATERIALS. 2010;31(2):270-278. EPUB 2009/09/29.

CHIEREGATO K, CASTEGNARO S, MADEO D, ET AL. EPIDERMAL GROWTH FACTOR, BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR AND PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB CAN SUBSTITUTE FOR FETAL BOVINE SERUM AND COMPETE WITH HUMAN PLATELET-RICH PLASMA IN THE EX VIVO EXPANSION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE. CYTOTHERAPY. 2011;13(8):933-943. EPUB 2011/06/01.

---

PRODUCCIÓN XENO-FREE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO Y  
EVALUACIÓN DE SU SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE

---

CHUNG C, BURDICK JA. ENGINEERING CARTILAGE TISSUE. *ADV DRUG DELIV REV.* 2008;60(2):243-262. EPUB 2007/11/03.

D'AUDIGIER C, GAUTIER B, YON A, ET AL. TARGETING VEGFR1 ON ENDOTHELIAL PROGENITORS MODULATES THEIR DIFFERENTIATION POTENTIAL. *ANGIOGENESIS.* 2014;17(3):603-616. EPUB 2014/01/15.

DA INES O, DEGROOTE F, GOUBELY C, ET AL. MEIOTIC RECOMBINATION IN ARABIDOPSIS IS CATALYSED BY DMC1, WITH RAD51 PLAYING A SUPPORTING ROLE. *PLOS GENET.* 2013;9(9):E1003787. EPUB 2013/10/03.

DA SILVA MEIRELLES L, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. MESENCHYMAL STEM CELLS RESIDE IN VIRTUALLY ALL POST-NATAL ORGANS AND TISSUES. *J CELL SCI.* 2006;119(Pt 11):2204-2213. EPUB 2006/05/11.

DAYAN V, YANNARELLI G, BILLIA F, ET AL. MESENCHYMAL STROMAL CELLS MEDIATE A SWITCH TO ALTERNATIVELY ACTIVATED MONOCYTES/MACROPHAGES AFTER ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION. *BASIC RES CARDIOL.* 2011;106(6):1299-1310. EPUB 2011/09/09.

DE TONI F, POGGIO S, YOUCEF AB, ET AL. HUMAN ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELLS EFFICIENTLY SUPPORT HEMATOPOIESIS IN VITRO AND IN VIVO: A KEY STEP FOR THERAPEUTIC STUDIES. *STEM CELLS DEV.* 2011;20(12):2127-2138. EPUB 2011/03/11.

DESHMANE SL, KREMLEV S, AMINI S, ET AL. MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 (MCP-1): AN OVERVIEW. *J INTERFERON CYTOKINE RES.* 2009;29(6):313-326.

DI BATTISTA JA, SHEBABY W, KIZILAY O, ET AL. PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (ASCs) INTO OSTEOBLASTIC LINEAGE ARE PASSAGE DEPENDENT. *INFLAMM RES.* 2014;63(11):907-917. EPUB 2014/08/08.

DOHAN EHRENFEST DM, ANDIA I, ZUMSTEIN MA, ET AL. CLASSIFICATION OF PLATELET CONCENTRATES (PLATELET-RICH PLASMA-PRP, PLATELET-RICH FIBRIN-PRF) FOR TOPICAL AND INFILTRATIVE USE IN ORTHOPEDIC AND SPORTS MEDICINE: CURRENT CONSENSUS, CLINICAL IMPLICATIONS AND PERSPECTIVES. *MUSCLES LIGAMENTS TENDONS J.* 2014;4(1):3-9. EPUB 2014/06/17.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, ET AL. MINIMAL CRITERIA FOR DEFINING MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS. THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY POSITION STATEMENT. *CYTOTHERAPY.* 2006;8(4):315-317. EPUB 2006/08/23.

---

DOUCET C, ERNOU I, ZHANG Y, ET AL. PLATELET LYSATES PROMOTE MESENCHYMAL STEM CELL EXPANSION: A SAFETY SUBSTITUTE FOR ANIMAL SERUM IN CELL-BASED THERAPY APPLICATIONS. J CELL PHYSIOL. 2005;205(2):228-236. EPUB 2005/05/12.

DRAKE CJ. EMBRYONIC AND ADULT VASCULOGENESIS. BIRTH DEFECTS RES C EMBRYO TODAY. 2003;69(1):73-82. EPUB 2003/05/29.

DRANOFF G. CYTOKINES IN CANCER PATHOGENESIS AND CANCER THERAPY. NAT REV CANCER. 2004;4(1):11-22. EPUB 2004/01/07.

EGGENHOFER E, HOOGDUJN MJ. MESENCHYMAL STEM CELL-EDUCATED MACROPHAGES. TRANSPLANT RES. 2012;1(1):12. EPUB 2013/02/02.

EIRO N, SENDON-LAGO J, SEOANE S, ET AL. POTENTIAL THERAPEUTIC EFFECT OF THE SECRETOME FROM HUMAN UTERINE CERVICAL STEM CELLS AGAINST BOTH CANCER AND STROMAL CELLS COMPARED WITH ADIPOSE TISSUE STEM CELLS. ONCOTARGET. 2014;5(21):10692-10708. EPUB 2014/10/10.

FEKETE N, GADELORGE M, FURST D, ET AL. PLATELET LYSATE FROM WHOLE BLOOD-DERIVED POOLED PLATELET CONCENTRATES AND APHERESIS-DERIVED PLATELET CONCENTRATES FOR THE ISOLATION AND EXPANSION OF HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS: PRODUCTION PROCESS, CONTENT AND IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPONENTS. CYTOTHERAPY. 2012A;14(5):540-554. EPUB 2012/02/03.

FEKETE N, ROJEWSKI MT, FURST D, ET AL. GMP-COMPLIANT ISOLATION AND LARGE-SCALE EXPANSION OF BONE MARROW-DERIVED MSC. PLOS ONE. 2012B;7(8):E43255. EPUB 2012/08/21.

FERRARA N. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR: BASIC SCIENCE AND CLINICAL PROGRESS. ENDOCR REV. 2004;25(4):581-611. EPUB 2004/08/06.

FERRARA N, GERBER HP, LECOATER J. THE BIOLOGY OF VEGF AND ITS RECEPTORS. NAT MED. 2003;9(6):669-676. EPUB 2003/06/05.

FIERRO F, ILLMER T, JING D, ET AL. INHIBITION OF PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTORBETA BY IMATINIB MESYLATE SUPPRESSES PROLIFERATION AND ALTERS DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS IN VITRO. CELL PROLIF. 2007;40(3):355-366. EPUB 2007/05/29.

GALVEZ BG, GENIS L, MATIAS-ROMAN S, ET AL. MEMBRANE TYPE 1-MATRIX METALLOPROTEINASE IS REGULATED BY CHEMOKINES MONOCYTE-CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1/CCL2 AND INTERLEUKIN-8/CXCL8 IN ENDOTHELIAL CELLS DURING ANGIOGENESIS. J BIOL CHEM. 2005;280(2):1292-1298. EPUB 2004/11/02.

GALLINA C, TURINETTO V, GIACHINO C. A NEW PARADIGM IN CARDIAC REGENERATION: THE MESENCHYMAL STEM CELL SECRETOME. STEM CELLS INT. 2015;2015:765846. EPUB 2015/06/16.

GEHMERT S, HIDAYAT M, SULTAN M, ET AL. ANGIOGENESIS: THE ROLE OF PDGF-BB ON ADIPOSE-TISSUE DERIVED STEM CELLS (ASCs). CLIN HEMORHEOL MICROCIRC. 2011;48(1):5-13. EPUB 2011/08/31.

GERTHOFFER WT. MECHANISMS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL MIGRATION. CIRC RES. 2007;100(5):607-621. EPUB 2007/03/17.

GNECCHI M, DANIELI P, CERVIO E. MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY FOR HEART DISEASE. VASCUL PHARMACOL. 2012;57(1):48-55. EPUB 2012/04/24.

GNECCHI M, HE H, LIANG OD, ET AL. PARACRINE ACTION ACCOUNTS FOR MARKED PROTECTION OF ISCHEMIC HEART BY AKT-MODIFIED MESENCHYMAL STEM CELLS. NAT MED. 2005;11(4):367-368. EPUB 2005/04/07.

GNECCHI M, HE H, NOISEUX N, ET AL. EVIDENCE SUPPORTING PARACRINE HYPOTHESIS FOR AKT-MODIFIED MESENCHYMAL STEM CELL-MEDIATED CARDIAC PROTECTION AND FUNCTIONAL IMPROVEMENT. FASEB J. 2006;20(6):661-669. EPUB 2006/04/04.

GNECCHI M, ZHANG Z, NI A, ET AL. PARACRINE MECHANISMS IN ADULT STEM CELL SIGNALING AND THERAPY. CIRC RES. 2008;103(11):1204-1219. EPUB 2008/11/26.

GOOLAERTS A, PELLAN-RANDRIANARISON N, LARGHERO J, ET AL. CONDITIONED MEDIA FROM MESENCHYMAL STROMAL CELLS RESTORE SODIUM TRANSPORT AND PRESERVE EPITHELIAL PERMEABILITY IN AN IN VITRO MODEL OF ACUTE ALVEOLAR INJURY. AM J PHYSIOL LUNG CELL MOL PHYSIOL. 2014;306(11):L975-985. EPUB 2014/04/01.

GRAYSON WL, BUNNELL BA, MARTIN E, ET AL. STROMAL CELLS AND STEM CELLS IN CLINICAL BONE REGENERATION. NAT REV ENDOCRINOL. 2015. EPUB 2015/01/07.

GRIFFITH CK, MILLER C, SAINSON RC, ET AL. DIFFUSION LIMITS OF AN IN VITRO THICK PREVASCULARIZED TISSUE. TISSUE ENG. 2005;11(1-2):257-266. EPUB 2005/03/02.

GRIFFITHS S, BARANIAK PR, COPLAND IB, ET AL. HUMAN PLATELET LYSATE STIMULATES HIGH-PASSAGE AND SENESCENT HUMAN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELL GROWTH AND REJUVENATION IN VITRO. CYTOTHERAPY. 2013;15(12):1469-1483. EPUB 2013/08/29.

---

GSTRAUNTHALER G. ALTERNATIVES TO THE USE OF FETAL BOVINE SERUM: SERUM-FREE CELL CULTURE. ALTEX. 2003;20(4):275-281. EPUB 2003/12/13.

GUPTA NK, ARMSTRONG EJ, PARIKH SA. THE CURRENT STATE OF STEM CELL THERAPY FOR PERIPHERAL ARTERY DISEASE. CURR CARDIOL REP. 2014;16(2):447. EPUB 2014/01/15.

HANLEY PJ, MEI Z, DA GRACA CABREIRA-HANSEN M, ET AL. MANUFACTURING MESENCHYMAL STROMAL CELLS FOR PHASE I CLINICAL TRIALS. CYTOTHERAPY. 2013;15(4):416-422. EPUB 2013/03/14.

HAQUE NS, FALLON JT, PAN JJ, ET AL. CHEMOKINE RECEPTOR-8 (CCR8) MEDIATES HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL CHEMOTAXIS AND METALLOPROTEINASE-2 SECRETION. BLOOD. 2004;103(4):1296-1304. EPUB 2003/10/25.

HARRISON P. PLATELET FUNCTION ANALYSIS. BLOOD REV. 2005;19(2):111-123. EPUB 2004/12/18.

HATZISTERGOS KE, QUEVEDO H, OSKOU EI BN, ET AL. BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS STIMULATE CARDIAC STEM CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION. CIRC RES. 2010;107(7):913-922. EPUB 2010/07/31.

HEIL M, EITENMULLER I, SCHMITZ-RIXEN T, ET AL. ARTERIOGENESIS VERSUS ANGIOGENESIS: SIMILARITIES AND DIFFERENCES. J CELL MOL MED. 2006;10(1):45-55. EPUB 2006/03/28.

HELDIN CH, WESTERMARK B. MECHANISM OF ACTION AND IN VIVO ROLE OF PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR. PHYSIOL REV. 1999;79(4):1283-1316. EPUB 1999/10/03.

HEMEDA H, KALZ J, WALENDA G, ET AL. HEPARIN CONCENTRATION IS CRITICAL FOR CELL CULTURE WITH HUMAN PLATELET LYSATE. CYTOTHERAPY. 2013;15(9):1174-1181. EPUB 2013/07/13.

HERRMANN JL, ABARBANELL AM, WEIL BR, ET AL. CELL-BASED THERAPY FOR ISCHEMIC HEART DISEASE: A CLINICAL UPDATE. ANN THORAC SURG. 2009;88(5):1714-1722. EPUB 2009/10/27.

HONG KH, RYU J, HAN KH. MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1-INDUCED ANGIOGENESIS IS MEDIATED BY VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A. BLOOD. 2005;105(4):1405-1407. EPUB 2004/10/23.

HORWITZ EM, GORDON PL, KOO WK, ET AL. ISOLATED ALLOGENEIC BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL CELLS ENGRAFT AND STIMULATE GROWTH IN CHILDREN WITH OSTEOGENESIS IMPERFECTA: IMPLICATIONS FOR CELL THERAPY OF BONE. PROC NATL ACAD SCI U S A. 2002;99(13):8932-8937. EPUB 2002/06/27.

---

HSIAO ST, ASGARI A, LOKMIC Z, ET AL. COMPARATIVE ANALYSIS OF PARACRINE FACTOR EXPRESSION IN HUMAN ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM BONE MARROW, ADIPOSE, AND DERMAL TISSUE. *STEM CELLS DEV.* 2012;21(12):2189-2203. EPUB 2011/12/23.

HUNG SC, POCHAMPALLY RR, CHEN SC, ET AL. ANGIOGENIC EFFECTS OF HUMAN MULTIPOTENT STROMAL CELL CONDITIONED MEDIUM ACTIVATE THE PI3K-AKT PATHWAY IN HYPOXIC ENDOTHELIAL CELLS TO INHIBIT APOPTOSIS, INCREASE SURVIVAL, AND STIMULATE ANGIOGENESIS. *STEM CELLS.* 2007;25(9):2363-2370. EPUB 2007/06/02.

ITALIANO JE, JR., RICHARDSON JL, PATEL-HETT S, ET AL. ANGIOGENESIS IS REGULATED BY A NOVEL MECHANISM: PRO- AND ANTIANGIOGENIC PROTEINS ARE ORGANIZED INTO SEPARATE PLATELET ALPHA GRANULES AND DIFFERENTIALLY RELEASED. *BLOOD.* 2008;111(3):1227-1233. EPUB 2007/10/27.

IZADPANAH R, TRYGG C, PATEL B, ET AL. BIOLOGIC PROPERTIES OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE. *J CELL BIOCHEM.* 2006;99(5):1285-1297. EPUB 2006/06/24.

JADCZYK T, FAULKNER A, MADEDDU P. STEM CELL THERAPY FOR CARDIOVASCULAR DISEASE: THE DEMISE OF ALCHEMY AND RISE OF PHARMACOLOGY. *BR J PHARMACOL.* 2013;169(2):247-268. EPUB 2012/06/21.

JAISWAL RK, JAISWAL N, BRUDER SP, ET AL. ADULT HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL DIFFERENTIATION TO THE OSTEOGENIC OR ADIPOGENIC LINEAGE IS REGULATED BY MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE. *J BIOL CHEM.* 2000;275(13):9645-9652. EPUB 2000/03/29.

JANECZEK PORTALSKA K, LEFERINK A, GROEN N, ET AL. ENDOTHELIAL DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS. *PLOS ONE.* 2012;7(10):e46842. EPUB 2012/10/12.

JANSSENS K, SLAETS H, HELLINGS N. IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF THE IL-6 CYTOKINE FAMILY IN MULTIPLE SCLEROSIS. *ANN N Y ACAD SCI.* 2015;1351:52-60. EPUB 2015/06/24.

JING W, XIAO J, XIONG Z, ET AL. EXPLANT CULTURE: AN EFFICIENT METHOD TO ISOLATE ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELLS FOR TISSUE ENGINEERING. *ARTIF ORGANS.* 2011;35(2):105-112. EPUB 2010/10/16.

JONSDOTTIR-BUCH SM, LIEDER R, SIGURJONSSON OE. PLATELET LYSATES PRODUCED FROM EXPIRED PLATELET CONCENTRATES SUPPORT GROWTH AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS. *PLOS ONE.* 2013;8(7):e68984. EPUB 2013/07/23.

---

JOUNG YH, LIM EJ, DARVIN P, ET AL. MSM ENHANCES GH SIGNALING VIA THE JAK2/STAT5B PATHWAY IN OSTEOBLAST-LIKE CELLS AND OSTEOBLAST DIFFERENTIATION THROUGH THE ACTIVATION OF STAT5B IN MSCs. PLOS ONE. 2012;7(10):e47477. EPUB 2012/10/17.

KAREY KP, MARQUARDT H, SIRBASKU DA. HUMAN PLATELET-DERIVED MITOGENS. I. IDENTIFICATION OF INSULINLIKE GROWTH FACTORS I AND II BY PURIFICATION AND N ALPHA AMINO ACID SEQUENCE ANALYSIS. BLOOD. 1989;74(3):1084-1092. EPUB 1989/08/15.

KEELEY EC, MEHRAD B, STRIETER RM. CHEMOKINES AS MEDIATORS OF NEOVASCULARIZATION. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL. 2008;28(11):1928-1936. EPUB 2008/09/02.

KEELEY EC, MEHRAD B, STRIETER RM. CHEMOKINES AS MEDIATORS OF TUMOR ANGIOGENESIS AND NEOVASCULARIZATION. EXP CELL RES. 2011;317(5):685-690. EPUB 2010/11/03.

KERN S, EICHLER H, STOEVE J, ET AL. COMPARATIVE ANALYSIS OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM BONE MARROW, UMBILICAL CORD BLOOD, OR ADIPOSE TISSUE. STEM CELLS. 2006;24(5):1294-1301. EPUB 2006/01/18.

KIDD S, SPAETH E, DEMBINSKI JL, ET AL. DIRECT EVIDENCE OF MESENCHYMAL STEM CELL TROPISM FOR TUMOR AND WOUNDING MICROENVIRONMENTS USING IN VIVO BIOLUMINESCENT IMAGING. STEM CELLS. 2009;27(10):2614-2623. EPUB 2009/08/04.

KIM EK, LIM S, PARK JM, ET AL. HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL DIFFERENTIATION TO THE OSTEOGENIC OR ADIPOGENIC LINEAGE IS REGULATED BY AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE. J CELL PHYSIOL. 2012;227(4):1680-1687. EPUB 2011/06/17.

KIM HJ, CHO YR, KIM SH, ET AL. TIMP-2-DERIVED 18-MER PEPTIDE INHIBITS ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION AND MIGRATION THROUGH cAMP/PKA-DEPENDENT MECHANISM. CANCER LETT. 2014;343(2):210-216. EPUB 2013/11/21.

KIM WS, PARK HS, SUNG JH. THE PIVOTAL ROLE OF PDGF AND ITS RECEPTOR ISOFORMS IN ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS. HISTOL HISTOPATHOL. 2015:11598. EPUB 2015/02/26.

KINNAIRD T, STABILE E, BURNETT MS, ET AL. MARROW-DERIVED STROMAL CELLS EXPRESS GENES ENCODING A BROAD SPECTRUM OF ARTERIOGENIC CYTOKINES AND PROMOTE IN VITRO AND IN VIVO ARTERIOGENESIS THROUGH PARACRINE MECHANISMS. CIRC RES. 2004A;94(5):678-685. EPUB 2004/01/24.

---

KINNAIRD T, STABILE E, BURNETT MS, ET AL. LOCAL DELIVERY OF MARROW-DERIVED STROMAL CELLS AUGMENTS COLLATERAL PERFUSION THROUGH PARACRINE MECHANISMS. CIRCULATION. 2004B;109(12):1543-1549. EPUB 2004/03/17.

KINZEBACH S, BIEBACK K. EXPANSION OF MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS UNDER XENOGENIC-FREE CULTURE CONDITIONS. ADV BIOCHEM ENG BIOTECHNOL. 2013;129:33-57. EPUB 2012/07/11.

KRAMPERA M, COSMI L, ANGELI R, ET AL. ROLE FOR INTERFERON-GAMMA IN THE IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS. STEM CELLS. 2006A;24(2):386-398. EPUB 2005/08/27.

KRAMPERA M, PIZZOLO G, APRILI G, ET AL. MESENCHYMAL STEM CELLS FOR BONE, CARTILAGE, TENDON AND SKELETAL MUSCLE REPAIR. BONE. 2006B;39(4):678-683. EPUB 2006/06/13.

KUMAR A, SALIMATH BP, STARK GB, ET AL. PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR SIGNALING IS NOT INVOLVED IN OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS. TISSUE ENG PART A. 2010;16(3):983-993. EPUB 2009/10/21.

KUPCOVA SKALNIKOVA H. PROTEOMIC TECHNIQUES FOR CHARACTERISATION OF MESENCHYMAL STEM CELL SECRETOME. BIOCHIMIE. 2013;95(12):2196-2211. EPUB 2013/07/25.

KYURKCHIEV D, BOCHEV I, IVANOVA-TODOROVA E, ET AL. SECRETION OF IMMUNOREGULATORY CYTOKINES BY MESENCHYMAL STEM CELLS. WORLD J STEM CELLS. 2014;6(5):552-570. EPUB 2014/11/27.

LAVOIE JR, ROSU-MYLES M. UNCOVERING THE SECRETES OF MESENCHYMAL STEM CELLS. BIOCHIMIE. 2013;95(12):2212-2221. EPUB 2013/07/03.

LE BLANC K, TAMMIK C, ROSENDAHL K, ET AL. HLA EXPRESSION AND IMMUNOLOGIC PROPERTIES OF DIFFERENTIATED AND UNDIFFERENTIATED MESENCHYMAL STEM CELLS. EXP HEMATOL. 2003;31(10):890-896. EPUB 2003/10/11.

LE ROITH D. THE INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR SYSTEM. EXP DIABESITY RES. 2003;4(4):205-212. EPUB 2003/12/12.

LEE IY, KIM J, KO EM, ET AL. INTERLEUKIN-4 INHIBITS THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR- AND BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR-INDUCED ANGIOGENESIS IN VITRO. MOL CELLS. 2002;14(1):115-121. EPUB 2002/09/24.



---

LEVY O, DVIR T, TSUR-GANG O, ET AL. SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 3-A KEY MOLECULAR SWITCH FOR HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL PROLIFERATION. *INT J BIOCHEM CELL BIOL*. 2008;40(11):2606-2618. EPUB 2008/06/28.

LIANG X, DING Y, ZHANG Y, ET AL. PARACRINE MECHANISMS OF MESENCHYMAL STEM CELL-BASED THERAPY: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES. *CELL TRANSPLANT*. 2014;23(9):1045-1059. EPUB 2013/05/17.

LIEKENS S, DE CLERCQ E, NEYTS J. ANGIOGENESIS: REGULATORS AND CLINICAL APPLICATIONS. *BIOCHEM PHARMACOL*. 2001;61(3):253-270. EPUB 2001/02/15.

LINERO I, CHAPARRO O. PARACRINE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE IN BONE REGENERATION. *PLoS ONE*. 2014A;9(9):E107001. EPUB 2014/09/10.

LINERO IM, DONCEL A, CHAPARRO O. [PROLIFERATION AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN HYDROGELS OF HUMAN BLOOD PLASMA]. *BIOMEDICA*. 2014B;34(1):67-78. EPUB 2014/06/27. PROLIFERACION Y DIFERENCIACION OSTEOGENICA DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES EN HIDROGELES DE PLASMA SANGUINEO HUMANO.

LING L, CAMILLERI ET, HELLEDIE T, ET AL. EFFECT OF HEPARIN ON THE BIOLOGICAL PROPERTIES AND MOLECULAR SIGNATURE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS. *GENE*. 2015. EPUB 2015/10/21.

LOPATINA T, BRUNO S, TETTA C, ET AL. PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR REGULATES THE SECRETION OF EXTRACELLULAR VESICLES BY ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS AND ENHANCES THEIR ANGIOGENIC POTENTIAL. *CELL COMMUN SIGNAL*. 2014;12:26. EPUB 2014/04/15.

MADRIGAL M, RAO KS, RIORDAN NH. A REVIEW OF THERAPEUTIC EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELL SECRETIONS AND INDUCTION OF SECRETORY MODIFICATION BY DIFFERENT CULTURE METHODS. *J TRANSL MED*. 2014;12:260. EPUB 2014/10/12.

MAGNUSSON PU, LOOMAN C, AHGREN A, ET AL. PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR-BETA CONSTITUTIVE ACTIVITY PROMOTES ANGIOGENESIS IN VIVO AND IN VITRO. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL*. 2007;27(10):2142-2149. EPUB 2007/07/28.

MALTAIS S, TREMBLAY JP, PERRAULT LP, ET AL. THE PARACRINE EFFECT: PIVOTAL MECHANISM IN CELL-BASED CARDIAC REPAIR. *J CARDIOVASC TRANSL RES*. 2010;3(6):652-662. EPUB 2010/06/19.

MANTOVANI A, SAVINO B, LOCATI M, ET AL. THE CHEMOKINE SYSTEM IN CANCER BIOLOGY AND THERAPY. *CYTOKINE GROWTH FACTOR REV*. 2010;21(1):27-39. EPUB 2009/12/17.

MARTIN MJ, MUOTRI A, GAGE F, ET AL. HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS EXPRESS AN IMMUNOGENIC NONHUMAN SIALIC ACID. NAT MED. 2005;11(2):228-232. EPUB 2005/02/03.

MARTINS L, MARTIN PK, HAN SW. ANGIOGENIC PROPERTIES OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN A MOUSE MODEL OF LIMB ISCHEMIA. METHODS MOL BIOL. 2014;1213:147-169. EPUB 2014/09/01.

MASON C, MCCALL MJ, CULME-SEYMOUR EJ, ET AL. THE GLOBAL CELL THERAPY INDUSTRY CONTINUES TO RISE DURING THE SECOND AND THIRD QUARTERS OF 2012. CELL STEM CELL. 2012;11(6):735-739. EPUB 2012/12/12.

MAXSON S, LOPEZ EA, YOO D, ET AL. CONCISE REVIEW: ROLE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN WOUND REPAIR. STEM CELLS TRANSL MED. 2012;1(2):142-149. EPUB 2012/12/01.

MCINTOSH K, ZVONIC S, GARRETT S, ET AL. THE IMMUNOGENICITY OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED CELLS: TEMPORAL CHANGES IN VITRO. STEM CELLS. 2006;24(5):1246-1253. EPUB 2006/01/18.

MIDDLETON K, JONES J, LWIN Z, ET AL. INTERLEUKIN-6: AN ANGIOGENIC TARGET IN SOLID TUMOURS. CRIT REV ONCOL HEMATOL. 2014;89(1):129-139. EPUB 2013/09/14.

MITCHELL JB, MCINTOSH K, ZVONIC S, ET AL. IMMUNOPHENOTYPE OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED CELLS: TEMPORAL CHANGES IN STROMAL-ASSOCIATED AND STEM CELL-ASSOCIATED MARKERS. STEM CELLS. 2006;24(2):376-385. EPUB 2005/12/03.

MIWA H, HASHIMOTO Y, TENSHO K, ET AL. XENO-FREE PROLIFERATION OF HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS. CYTOTECNOLOGY. 2012;64(3):301-308. EPUB 2011/10/18.

MIZUNO H, TOBITA M, UYSAL AC. CONCISE REVIEW: ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS AS A NOVEL TOOL FOR FUTURE REGENERATIVE MEDICINE. STEM CELLS. 2012;30(5):804-810. EPUB 2012/03/15.

MOJICA-HENSHAW MP, JACOBSON P, MORRIS J, ET AL. SERUM-CONVERTED PLATELET LYSATE CAN SUBSTITUTE FOR FETAL BOVINE SERUM IN HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELL CULTURES. CYTOTHERAPY. 2013;15(12):1458-1468. EPUB 2013/11/10.

MOON MH, KIM SY, KIM YJ, ET AL. HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IMPROVE POSTNATAL NEOVASCULARIZATION IN A MOUSE MODEL OF HINDLIMB ISCHEMIA. CELL PHYSIOL BIOCHEM. 2006;17(5-6):279-290. EPUB 2006/06/23.

---

MOZAFFARIAN D, BENJAMIN EJ, GO AS, ET AL. HEART DISEASE AND STROKE STATISTICS-2015 UPDATE: A REPORT FROM THE AMERICAN HEART ASSOCIATION. CIRCULATION. 2014. EPUB 2014/12/19.

MULLER-EHMSSEN J, KRAUSGRILL B, BURST V, ET AL. EFFECTIVE ENGRAFTMENT BUT POOR MID-TERM PERSISTENCE OF MONONUCLEAR AND MESENCHYMAL BONE MARROW CELLS IN ACUTE AND CHRONIC RAT MYOCARDIAL INFARCTION. J MOL CELL CARDIOL. 2006;41(5):876-884. EPUB 2006/09/16.

MURRAY IR, WEST CC, HARDY WR, ET AL. NATURAL HISTORY OF MESENCHYMAL STEM CELLS, FROM VESSEL WALLS TO CULTURE VESSELS. CELL MOL LIFE SCI. 2013. EPUB 2013/10/26.

MUSCARI C, BONAFAE F, MARTIN-SUAREZ S, ET AL. RESTORED PERFUSION AND REDUCED INFLAMMATION IN THE INFARCTED HEART AFTER GRAFTING STEM CELLS WITH A HYALURONAN-BASED SCAFFOLD. J CELL MOL MED. 2013;17(4):518-530. EPUB 2013/03/14.

NAKAJIMA H, UCHIDA K, GUERRERO AR, ET AL. TRANSPLANTATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS PROMOTES AN ALTERNATIVE PATHWAY OF MACROPHAGE ACTIVATION AND FUNCTIONAL RECOVERY AFTER SPINAL CORD INJURY. J NEUROTRAUMA. 2012;29(8):1614-1625. EPUB 2012/01/12.

NAUTA AJ, KRUISSELBRINK AB, LURVINK E, ET AL. MESENCHYMAL STEM CELLS INHIBIT GENERATION AND FUNCTION OF BOTH CD34+-DERIVED AND MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS. J IMMUNOL. 2006;177(4):2080-2087. EPUB 2006/08/05.

OTROCK ZK, MAHFOUZ RA, MAKAREM JA, ET AL. UNDERSTANDING THE BIOLOGY OF ANGIOGENESIS: REVIEW OF THE MOST IMPORTANT MOLECULAR MECHANISMS. BLOOD CELLS MOL DIS. 2007;39(2):212-220. EPUB 2007/06/08.

PAEK HJ, KIM C, WILLIAMS SK. ADIPOSE STEM CELL-BASED REGENERATIVE MEDICINE FOR REVERSAL OF DIABETIC HYPERGLYCEMIA. WORLD J DIABETES. 2014;5(3):235-243. EPUB 2014/06/18.

PAREKKADAN B, MILWID JM. MESENCHYMAL STEM CELLS AS THERAPEUTICS. ANNU REV BIOMED ENG. 2010;12:87-117. EPUB 2010/04/27.

PENG L, JIA Z, YIN X, ET AL. COMPARATIVE ANALYSIS OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM BONE MARROW, CARTILAGE, AND ADIPOSE TISSUE. STEM CELLS DEV. 2008;17(4):761-773. EPUB 2008/04/09.

PENG Y, XUAN M, ZOU J, ET AL. FREEZE-DRIED RAT BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL PARACRINE FACTORS: A SIMPLIFIED NOVEL MATERIAL FOR SKIN WOUND THERAPY. TISSUE ENG PART A. 2015;21(5-6):1036-1046. EPUB 2014/10/25.

---

PEREIRA T, ARMADA-DA SILVA PA, AMORIM I, ET AL. EFFECTS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS ISOLATED FROM WHARTON'S JELLY OF THE UMBILICAL CORD AND CONDITIONED MEDIA ON SKELETAL MUSCLE REGENERATION USING A MYECTOMY MODEL. STEM CELLS INT. 2014;2014:376918. EPUB 2014/11/08.

PHINNEY DG. BUILDING A CONSENSUS REGARDING THE NATURE AND ORIGIN OF MESENCHYMAL STEM CELLS. J CELL BIOCHEM SUPPL. 2002;38:7-12. EPUB 2002/06/06.

PHINNEY DG, PROCKOP DJ. CONCISE REVIEW: MESENCHYMAL STEM/MULTIPOTENT STROMAL CELLS: THE STATE OF TRANSDIFFERENTIATION AND MODES OF TISSUE REPAIR--CURRENT VIEWS. STEM CELLS. 2007;25(11):2896-2902. EPUB 2007/09/29.

PIETRAMAGGIORI G, KAIPAINEN A, CZECZUGA JM, ET AL. FREEZE-DRIED PLATELET-RICH PLASMA SHOWS BENEFICIAL HEALING PROPERTIES IN CHRONIC WOUNDS. WOUND REPAIR REGEN. 2006;14(5):573-580. EPUB 2006/10/04.

PIETRAMAGGIORI G, SCHERER SS, MATHEWS JC, ET AL. HEALING MODULATION INDUCED BY FREEZE-DRIED PLATELET-RICH PLASMA AND MICRONIZED ALLOGENIC DERMIS IN A DIABETIC WOUND MODEL. WOUND REPAIR REGEN. 2008;16(2):218-225. EPUB 2008/03/06.

PIPP F, BOEHM S, CAI WJ, ET AL. ELEVATED FLUID SHEAR STRESS ENHANCES POSTOCCLUSIVE COLLATERAL ARTERY GROWTH AND GENE EXPRESSION IN THE PIG HIND LIMB. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL. 2004;24(9):1664-1668. EPUB 2004/07/10.

PLANAT-BENARD V, SILVESTRE JS, COUSIN B, ET AL. PLASTICITY OF HUMAN ADIPOSE LINEAGE CELLS TOWARD ENDOTHELIAL CELLS: PHYSIOLOGICAL AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES. CIRCULATION. 2004;109(5):656-663. EPUB 2004/01/22.

POLVERINI PJ. ANGIOGENESIS IN HEALTH AND DISEASE: INSIGHTS INTO BASIC MECHANISMS AND THERAPEUTIC OPPORTUNITIES. J DENT EDUC. 2002;66(8):962-975. EPUB 2002/09/07.

PREVOSTO C, ZANCOLLI M, CANEVALI P, ET AL. GENERATION OF CD4+ OR CD8+ REGULATORY T CELLS UPON MESENCHYMAL STEM CELL-LYMPHOCYTE INTERACTION. HAEMATOLOGICA. 2007;92(7):881-888. EPUB 2007/07/04.

PROCKOP DJ. "STEMNESS" DOES NOT EXPLAIN THE REPAIR OF MANY TISSUES BY MESENCHYMAL STEM/MULTIPOTENT STROMAL CELLS (MSCs). CLIN PHARMACOL THER. 2007;82(3):241-243. EPUB 2007/08/19.

---

PROCKOP DJ. REPAIR OF TISSUES BY ADULT STEM/PROGENITOR CELLS (MSCs): CONTROVERSIES, MYTHS, AND CHANGING PARADIGMS. *MOL THER.* 2009;17(6):939-946. EPUB 2009/04/02.

PUGH CW, RATCLIFFE PJ. REGULATION OF ANGIOGENESIS BY HYPOXIA: ROLE OF THE HIF SYSTEM. *NAT MED.* 2003;9(6):677-684. EPUB 2003/06/05.

QUIRICI N, SCAVULLO C, DE GIROLAMO L, ET AL. ANTI-L-NGFR AND -CD34 MONOCLONAL ANTIBODIES IDENTIFY MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS IN HUMAN ADIPOSE TISSUE. *STEM CELLS DEV.* 2010;19(6):915-925. EPUB 2009/11/26.

RASMUSSEN I, UHLIN M, LE BLANC K, ET AL. MESENCHYMAL STEM CELLS FAIL TO TRIGGER EFFECTOR FUNCTIONS OF CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES. *J LEUKOC BIOL.* 2007;82(4):887-893. EPUB 2007/07/05.

RATCLIFFE E, GLEN KE, NAING MW, ET AL. CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES ON STEM CELL-BASED THERAPIES UNDERGOING CLINICAL TRIALS FOR REGENERATIVE MEDICINE: CASE STUDIES. *BR MED BULL.* 2013;108:73-94. EPUB 2013/11/10.

REIKVAM H, BRENNER AK, HAGEN KM, ET AL. THE CYTOKINE-MEDIATED CROSSTALK BETWEEN PRIMARY HUMAN ACUTE MYELOID CELLS AND MESENCHYMAL STEM CELLS ALTERS THE LOCAL CYTOKINE NETWORK AND THE GLOBAL GENE EXPRESSION PROFILE OF THE MESENCHYMAL CELLS. *STEM CELL RES.* 2015;15(3):530-541. EPUB 2015/10/16.

RESTREPO-JIMENEZ SX. SECRECIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS EN CONDICIONES DE NORMOXIA E HIPOXIA EN CÉLULAS STEM MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA Y TEJIDO ADIPOSO. BOGOTÁ: UNIVERSIDAD NACIONAL - SEDE BOGOTÁ; 2009.

RIBATTI D, VACCA A, NICO B, ET AL. POSTNATAL VASCULOGENESIS. *MECH DEV.* 2001;100(2):157-163. EPUB 2001/02/13.

RIIS S, NIELSEN FM, PENNISI CP, ET AL. COMPARATIVE ANALYSIS OF MEDIA AND SUPPLEMENTS ON INITIATION AND EXPANSION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS. *STEM CELLS TRANSL MED.* 2016;5(3):314-324. EPUB 2016/02/04.

ROMANOV YA, SVINTSITSKAYA VA, SMIRNOV VN. SEARCHING FOR ALTERNATIVE SOURCES OF POSTNATAL HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS: CANDIDATE MSC-LIKE CELLS FROM UMBILICAL CORD. *STEM CELLS.* 2003;21(1):105-110. EPUB 2003/01/17.

---

ROUWKEMA J, RIVRON NC, VAN BLITTERSWIJK CA. VASCULARIZATION IN TISSUE ENGINEERING. TRENDS BIOTECHNOL. 2008;26(8):434-441. EPUB 2008/07/01.

SALCEDO R, PONCE ML, YOUNG HA, ET AL. HUMAN ENDOTHELIAL CELLS EXPRESS CCR2 AND RESPOND TO MCP-1: DIRECT ROLE OF MCP-1 IN ANGIOGENESIS AND TUMOR PROGRESSION. BLOOD. 2000;96(1):34-40. EPUB 2000/07/13.

SANGANALMATH SK, BOLLI R. CELL THERAPY FOR HEART FAILURE: A COMPREHENSIVE OVERVIEW OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES, CURRENT CHALLENGES, AND FUTURE DIRECTIONS. CIRC RES. 2013;113(6):810-834. EPUB 2013/08/31.

SCHALLMOSEK K, BARTMANN C, ROHDE E, ET AL. HUMAN PLATELET LYSATE CAN REPLACE FETAL BOVINE SERUM FOR CLINICAL-SCALE EXPANSION OF FUNCTIONAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS. TRANSFUSION. 2007;47(8):1436-1446. EPUB 2007/07/28.

SCHMIDT A, BRIXIUS K, BLOCH W. ENDOTHELIAL PRECURSOR CELL MIGRATION DURING VASCULOGENESIS. CIRC RES. 2007;101(2):125-136. EPUB 2007/07/21.

SCHOLZ D, CAI WJ, SCHAPER W. ARTERIOGENESIS, A NEW CONCEPT OF VASCULAR ADAPTATION IN OCCLUSIVE DISEASE. ANGIOGENESIS. 2001;4(4):247-257. EPUB 2002/08/29.

SELVAGGI TA, WALKER RE, FLEISHER TA. DEVELOPMENT OF ANTIBODIES TO FETAL CALF SERUM WITH ARTHUS-LIKE REACTIONS IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED PATIENTS GIVEN SYNGENEIC LYMPHOCYTE INFUSIONS. BLOOD. 1997;89(3):776-779. EPUB 1997/02/01.

SHABBIR A, ZISA D, SUZUKI G, ET AL. HEART FAILURE THERAPY MEDIATED BY THE TROPIC ACTIVITIES OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS: A NONINVASIVE THERAPEUTIC REGIMEN. AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL. 2009;296(6):H1888-1897. EPUB 2009/04/28.

SILVESTRE JS, MALLAT Z, DURIEZ M, ET AL. ANTIANGIOGENIC EFFECT OF INTERLEUKIN-10 IN ISCHEMIA-INDUCED ANGIOGENESIS IN MICE HINDLIMB. CIRC RES. 2000;87(6):448-452. EPUB 2000/09/16.

SIMONS M. ANGIOGENESIS: WHERE DO WE STAND NOW? CIRCULATION. 2005;111(12):1556-1566. EPUB 2005/03/30.

SONG BQ, CHI Y, LI X, ET AL. INHIBITION OF NOTCH SIGNALING PROMOTES THE ADIPOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS THROUGH AUTOPHAGY ACTIVATION AND PTEN-PI3K/AKT/MTOR PATHWAY. CELL PHYSIOL BIOCHEM. 2015;36(5):1991-2002. EPUB 2015/07/24.

---

SOZZANI S, DEL PRETE A, BONECCHI R, ET AL. CHEMOKINES AS EFFECTOR AND TARGET MOLECULES IN VASCULAR BIOLOGY. *CARDIOVASC RES.* 2015;107(3):364-372. EPUB 2015/05/15.

SPAGGIARI GM, CAPOBIANCO A, ABDELRAZIK H, ET AL. MESENCHYMAL STEM CELLS INHIBIT NATURAL KILLER-CELL PROLIFERATION, CYTOTOXICITY, AND CYTOKINE PRODUCTION: ROLE OF INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE AND PROSTAGLANDIN E2. *BLOOD.* 2008;111(3):1327-1333. EPUB 2007/10/24.

SPEES JL, GREGORY CA, SINGH H, ET AL. INTERNALIZED ANTIGENS MUST BE REMOVED TO PREPARE HYPOIMMUNOGENIC MESENCHYMAL STEM CELLS FOR CELL AND GENE THERAPY. *MOL THER.* 2004;9(5):747-756. EPUB 2004/05/04.

SQUILLARO T, PELUSO G, GALDERISI U. CLINICAL TRIALS WITH MESENCHYMAL STEM CELLS: AN UPDATE. *CELL TRANSPLANT.* 2015. EPUB 2015/10/02.

STREM BM, HICOK KC, ZHU M, ET AL. MULTIPOTENTIAL DIFFERENTIATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS. *KEIO J MED.* 2005;54(3):132-141. EPUB 2005/10/21.

SUNDIN M, RINGDEN O, SUNDBERG B, ET AL. NO ALLOANTIBODIES AGAINST MESENCHYMAL STROMAL CELLS, BUT PRESENCE OF ANTI-FETAL CALF SERUM ANTIBODIES, AFTER TRANSPLANTATION IN ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL RECIPIENTS. *HAEMATOLOGICA.* 2007;92(9):1208-1215. EPUB 2007/08/02.

SWART JF, WULFFRAAT NM. MESENCHYMAL STROMAL CELLS FOR TREATMENT OF ARTHRITIS. *BEST PRACT RES CLIN RHEUMATOL.* 2014;28(4):589-603. EPUB 2014/12/08.

SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, ET AL. STRING V10: PROTEIN-PROTEIN INTERACTION NETWORKS, INTEGRATED OVER THE TREE OF LIFE. *NUCLEIC ACIDS RES.* 2015;43(DATABASE ISSUE):D447-452. EPUB 2014/10/30.

TANG X, PIKAL MJ. DESIGN OF FREEZE-DRYING PROCESSES FOR PHARMACEUTICALS: PRACTICAL ADVICE. *PHARM RES.* 2004;21(2):191-200. EPUB 2004/03/23.

TANG Y, TIAN XC. JAK-STAT3 AND SOMATIC CELL REPROGRAMMING. *JAKSTAT.* 2013;2(4):E24935. EPUB 2014/01/29.

TEKKATTE C, GUNASINGH GP, CHERIAN KM, ET AL. "HUMANIZED" STEM CELL CULTURE TECHNIQUES: THE ANIMAL SERUM CONTROVERSY. *STEM CELLS INT.* 2011;2011:504723. EPUB 2011/05/24.

---

TIAN M, NEIL JR, SCHIEMANN WP. TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA AND THE HALLMARKS OF CANCER. CELL SIGNAL. 2011;23(6):951-962. EPUB 2010/10/14.

TOMA C, PITTENGER MF, CAHILL KS, ET AL. HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS DIFFERENTIATE TO A CARDIOMYOCYTE PHENOTYPE IN THE ADULT MURINE HEART. CIRCULATION. 2002;105(1):93-98. EPUB 2002/01/05.

TOMASONI S, LONGARETTI L, ROTA C, ET AL. TRANSFER OF GROWTH FACTOR RECEPTOR MRNA VIA EXOSOMES UNRAVELS THE REGENERATIVE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS. STEM CELLS DEV. 2013;22(5):772-780. EPUB 2012/10/23.

TRAKTUEV DO, MERFELD-CLAUSS S, LI J, ET AL. A POPULATION OF MULTIPOTENT CD34-POSITIVE ADIPOSE STROMAL CELLS SHARE PERICYTE AND MESENCHYMAL SURFACE MARKERS, RESIDE IN A PERIENDOTHELIAL LOCATION, AND STABILIZE ENDOTHELIAL NETWORKS. CIRC RES. 2008;102(1):77-85. EPUB 2007/10/31.

TROIDL K, SCHAPER W. ARTERIOGENESIS VERSUS ANGIOGENESIS IN PERIPHERAL ARTERY DISEASE. DIABETES METAB RES REV. 2012;28 SUPPL 1:27-29. EPUB 2012/02/01.

TROIDL K, TRIBULOVA S, CAI WJ, ET AL. EFFECTS OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE AND OF DETA NONOATE IN ARTERIOGENESIS. J CARDIOVASC PHARMACOL. 2010;55(2):153-160. EPUB 2010/02/23.

TROJAHN KOLLE SF, OLIVERI RS, GLOVINSKI PV, ET AL. POOLED HUMAN PLATELET LYSATE VERSUS FETAL BOVINE SERUM-INVESTIGATING THE PROLIFERATION RATE, CHROMOSOME STABILITY AND ANGIOGENIC POTENTIAL OF HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS INTENDED FOR CLINICAL USE. CYTOTHERAPY. 2013;15(9):1086-1097. EPUB 2013/04/23.

UEMURA R, XU M, AHMAD N, ET AL. BONE MARROW STEM CELLS PREVENT LEFT VENTRICULAR REMODELING OF ISCHEMIC HEART THROUGH PARACRINE SIGNALING. CIRC RES. 2006;98(11):1414-1421. EPUB 2006/05/13.

VAN BELLE E, WITZENBICHLER B, CHEN D, ET AL. POTENTIATED ANGIOGENIC EFFECT OF SCATTER FACTOR/HEPATOCYTE GROWTH FACTOR VIA INDUCTION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR: THE CASE FOR PARACRINE AMPLIFICATION OF ANGIOGENESIS. CIRCULATION. 1998;97(4):381-390. EPUB 1998/02/19.

VAN DEN BOS C, KEEFE R, SCHIRMAIER C, ET AL. THERAPEUTIC HUMAN CELLS: MANUFACTURE FOR CELL THERAPY/REGENERATIVE MEDICINE. ADV BIOCHEM ENG BIOTECHNOL. 2013. EPUB 2013/08/13.



---

VAN DEN DOLDER J, MOOREN R, VLOON AP, ET AL. PLATELET-RICH PLASMA: QUANTIFICATION OF GROWTH FACTOR LEVELS AND THE EFFECT ON GROWTH AND DIFFERENTIATION OF RAT BONE MARROW CELLS. *TISSUE ENG.* 2006;12(11):3067-3073. EPUB 2007/05/24.

WAGNER W, WEIN F, SECKINGER A, ET AL. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM HUMAN BONE MARROW, ADIPOSE TISSUE, AND UMBILICAL CORD BLOOD. *EXP HEMATOL.* 2005;33(11):1402-1416. EPUB 2005/11/03.

WARNKE PH, HUMPE A, STRUNK D, ET AL. A CLINICALLY-FEASIBLE PROTOCOL FOR USING HUMAN PLATELET LYSATE AND MESENCHYMAL STEM CELLS IN REGENERATIVE THERAPIES. *J CRANIOMAXILLOFAC SURG.* 2013;41(2):153-161. EPUB 2012/08/11.

WATABE T, MIYAZONO K. ROLES OF TGF-BETA FAMILY SIGNALING IN STEM CELL RENEWAL AND DIFFERENTIATION. *CELL RES.* 2009;19(1):103-115. EPUB 2008/12/31.

WEIBRICH G, KLEIS WK, HAFNER G, ET AL. COMPARISON OF PLATELET, LEUKOCYTE, AND GROWTH FACTOR LEVELS IN POINT-OF-CARE PLATELET-ENRICHED PLASMA, PREPARED USING A MODIFIED CURASAN KIT, WITH PREPARATIONS RECEIVED FROM A LOCAL BLOOD BANK. *CLIN ORAL IMPLANTS RES.* 2003;14(3):357-362. EPUB 2003/05/21.

WELTI J, LOGES S, DIMMELER S, ET AL. RECENT MOLECULAR DISCOVERIES IN ANGIOGENESIS AND ANTIANGIOGENIC THERAPIES IN CANCER. *J CLIN INVEST.* 2013;123(8):3190-3200. EPUB 2013/08/03.

WU J, NIU J, LI X, ET AL. DOWNREGULATION OF BETA-CATENIN AND AKT SIGNALING IS RESPONSIBLE FOR POOR PROLIFERATION OF THE LATE PASSAGE OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS. *MOL MED REP.* 2014;10(2):955-958. EPUB 2014/06/04.

XU H, YANG YJ, QIAN HY, ET AL. ROSUVASTATIN TREATMENT ACTIVATES JAK-STAT PATHWAY AND INCREASES EFFICACY OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION IN INFARCTED HEARTS. *CIRC J.* 2011;75(6):1476-1485. EPUB 2011/04/20.

ZENG W, JU R, MAO M. THERAPEUTIC POTENTIAL OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR AGAINST CEREBRAL ISCHEMIA (REVIEW). *EXP THER MED.* 2015;9(2):283-288. EPUB 2015/01/13.

ZHOU Z, CHEN Y, ZHANG H, ET AL. COMPARISON OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM HUMAN BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE FOR THE TREATMENT OF SPINAL CORD INJURY. *CYTOTHERAPY.* 2013;15(4):434-448. EPUB 2013/02/05.

---

ZUFFEREY A, FONTANA P, RENY JL, ET AL. PLATELET PROTEOMICS. MASS SPECTROM REV. 2012;31(2):331-351. EPUB 2011/10/20.

ZUK PA. THE ADIPOSE-DERIVED STEM CELL: LOOKING BACK AND LOOKING AHEAD. MOL BIOL CELL. 2010;21(11):1783-1787. EPUB 2010/04/09.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1

#### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo \_\_\_\_\_ mayor de edad, identificado (a) con Cédula de Ciudadanía N° \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_; autorizo que se entregue una muestra de aproximadamente 10 gramos del tejido adiposo que me será extraído, a los grupos de investigación:

- Ciencias Básicas en Salud de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud
- Grupo de Biología de Células Madre de la Universidad Nacional – Sede Bogotá.

Estoy enterado de que este tejido será empleado para extraer células madre mesenquimales, las cuales serán usadas para el desarrollo de proyectos de investigación

---

PRODUCCIÓN XENO-FREE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO Y  
EVALUACIÓN DE SU SECRETOMA NEOVASCULARIZANTE

básica y aplicada. Entiendo que estas células serán estudiadas sin considerar mi identidad, sexo, edad u otro dato privado, por lo cual esta información no podrá ser consultada bajo ninguna circunstancia.

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Responsable:

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Testigo:

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

### ARTÍCULO ORIGINAL

Escobar C, Chaparro O. Xeno-Free Extraction, Culture, and Cryopreservation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* In press.