

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**IMPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES ADULTAS
DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO EN UNA MATRIZ
DÉRMICA ACELULAR (INTEGRA[®]) PARA OPTIMIZAR LA
CICATRIZACIÓN EN ÁREAS DESPROVISTAS DE PIEL:
ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS**

Dr. Manuel Antonio Meruane Naranjo

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCION MORFOLOGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dra. Mariana Rojas Rauco

2011

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Manuel Antonio Meruane Naranjo

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biomédicas con mención en Morfología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de junio de 2011.

Prof. Dra. Mariana Rojas Rauco
Directora de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Eduardo Bustos Obregón Prof. Dr. David Lemus Acuña

Prof. Dr. Raúl Sánchez Gutiérrez

*Dedicado a mis padres Sibiana y Teodoro,
quienes por sobre todo han valorado mi educación y
me han iniciado en el camino de la investigación.*

Agradecimientos

A la Dra. Mariana Rojas Rauco por su apoyo y motivación constante, por su entrega y generosidad, por incorporarme en múltiples actividades y por confiar en mí.

Al Dr. Arturo Ferreira V. por facilitar el laboratorio de criogenia y cultivos celulares.

Al Dr. Roberto Hoppmann K. por la formación quirúrgica recibida.

A la Dra. Laura Walker por facilitar el microscopio de fluorescencia.

A la Dra. Katherine Marcelain por su colaboración en microscopía de fluorescencia.

A Dra. Jacqueline Yáñez del Hospital de niños Exequiel González Cortés por colaborar con material Integra®.

A Bárbara Karkling M. y Francisco Escudero M. de Promedon Ltda. por donar material Integra®.

A Simón Saavedra por las múltiples ilustraciones y ediciones fotográficas realizadas.

ÍNDICE

I.	Resumen	6
II.	Abstract	7
III.	Introducción	8
IV.	Marco Teórico	
	IV.1. Introducción a la medicina regenerativa	12
	IV.2. Células troncales y pluripotenciales	18
	IV.3. Células troncales derivadas del tejido adiposo	28
	IV.4. Sustitutos cutáneos	44
V.	Hipótesis de trabajo	50
VI.	Objetivos	51
VII.	Material y método	52
VIII.	Resultados	62
IX.	Discusión	73
X.	Conclusión	78
XI.	Referencias	79

I. Resumen

El tratamiento quirúrgico de las lesiones que incluyen pérdida de tejido cutáneo ha presentado importantes innovaciones con el advenimiento de la medicina regenerativa y la bioingeniería tisular, esto ha incluido dentro de las alternativas terapéuticas el uso de sustitutos dérmicos y células troncales. El éxito de la regeneración tisular depende de una vascularización local óptima, adicional a la adecuada integración del sustituto dérmico al individuo. En el presente estudio se combina el uso de células troncales derivadas del tejido adiposo autólogo (ASCs) con un sustituto dérmico disponible comercialmente (Integra®) para regeneración dérmica. Las células troncales obtenidas de la región inguinal de 8 ratas adultas son sembradas en un segmento de sustituto dérmico por 48 horas, luego implantadas en la misma rata, comparando la evolución con un implante contralateral sin ASCs. Transcurridas 1, 2 y 3 semanas de regeneración *en vivo*, se retiran los implantes para evaluación histológica. Nuestros resultados muestran que los implantes se integran adecuadamente al tejido autólogo, que las ASCs aumentan significativamente la densidad microvascular ($7.7 \pm 0.6\%$ vs. $5.3 \pm 0.5\%$, evaluado mediante tinción inmunohistoquímica anti-factor VIII) y la síntesis de colágeno tipo I ($24 \pm 3\%$ vs. $16 \pm 2\%$, evaluado mediante la tinción rojo sirio de Junqueira). Si bien hubo una mayor epidermización en el lado tratado con ASCs (2530 vs. 1911 μm), evaluado mediante tinción inmunohistoquímica anti-citoqueratina 34 β E12, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. No se identificó diferenciación de nuevas células epidérmicas en el período de tiempo estudiado. De este modo, nuestros datos sugieren que la siembra de ASCs en un sustituto dérmico mejora la regeneración cutánea y la integración tisular mediante un aumento de la vascularización y síntesis de colágeno.

II. Abstract

Surgical treatment of injuries with loss of skin tissue has made significant innovations with the advent of regenerative medicine and tissue bioengineering, this has included the use of stem cell and dermal substitutes. The success of tissue regeneration depends on an optimal local vascularization, in addition to the successful integration of the artificial skin. The present study combines the use of autologous adipose tissue derived stem cells derived (ASCs) with a commercially available dermal substitute (Integra®) for skin regeneration. The ASCs obtained from the inguinal region of 8 adult rats are seeded in a piece of dermal substitute for 48 hours, and then implanted in the same rat, comparing the evolution with a contralateral implant without ASCs. After 1, 2 and 3 weeks of regeneration in vivo, implants were removed for histological evaluation. Our results show that the implants are properly integrated with autologous tissue, the ASCs significantly increased microvascular density ($7.7 \pm 0.6\%$ vs. $5.3 \pm 0.5\%$, assessed by immunohistochemical staining anti-factor VIII) and the synthesis of type I collagen ($24 \pm 3\%$ vs. $16 \pm 2\%$, assessed by Junqueira Sirius red staining). While there was a greater epithelialisation on the side treated with ASCs (2530 vs. 1911 microns), assessed by anti-cytokeratin immunohistochemistry staining 34 β E12, this difference was not statistically significant. Not identified differentiation of new epidermal cells in the time period studied. Thus, our data suggest that seeding ASCs in a dermal substitute improve skin regeneration and tissue integration by increasing vascularity and collagen synthesis.

III. Introducción

En un individuo adulto la pérdida de piel puede ocurrir por múltiples causas, que incluyen enfermedades genéticas, trauma, heridas crónicas o post-quirúrgicas (ej: luego de resecciones tumorales). Una de las causas más comunes de pérdida importante de piel son las quemaduras. Además de la extensión, la pérdida de piel se clasifica según la profundidad del daño; de este modo tendremos lesiones **superficiales** las cuales comprometen sólo el estrato epidérmico, lesiones **intermedias** que comprometen el estrato epidérmico y parte de la dermis y lesiones **profundas** que comprometen la piel en todo su espesor.

Una lesión superficial puede cicatrizar con la reserva de células basales de la epidermis y una lesión intermedia con la reserva de células epiteliales y pluripotenciales de los folículos pilosos, glándulas sebáceas y bordes de la herida. Pero una lesión profunda cicatriza por contracción de la herida y epitelización de los bordes, generando una cicatriz retráctil, deforme y con poca movilidad. Adicionalmente un problema que complica la etapa aguda de estas lesiones profundas y extensas es la pérdida de temperatura corporal y líquidos, además de favorecer la entrada de gérmenes y exacerbación de la respuesta inflamatoria.

Es por estos motivos que se prefiere la cobertura precoz en lesiones profundas, siendo el injerto de piel dermoepidérmico autólogo del paciente la primera elección (Figura 1). Por diversos motivos puede resultar difícil la cobertura inmediata con piel autóloga, ante lo cual se puede disponer de otros materiales, dentro de los cuales destacan los sustitutos de piel desarrollados por bioingeniería. Es tal la importancia y la demanda de estos productos de reemplazo cutáneo, que a nivel mundial existen muchos grupos focalizados en desarrollar nuevos materiales (Shevchenko et al. 2010).

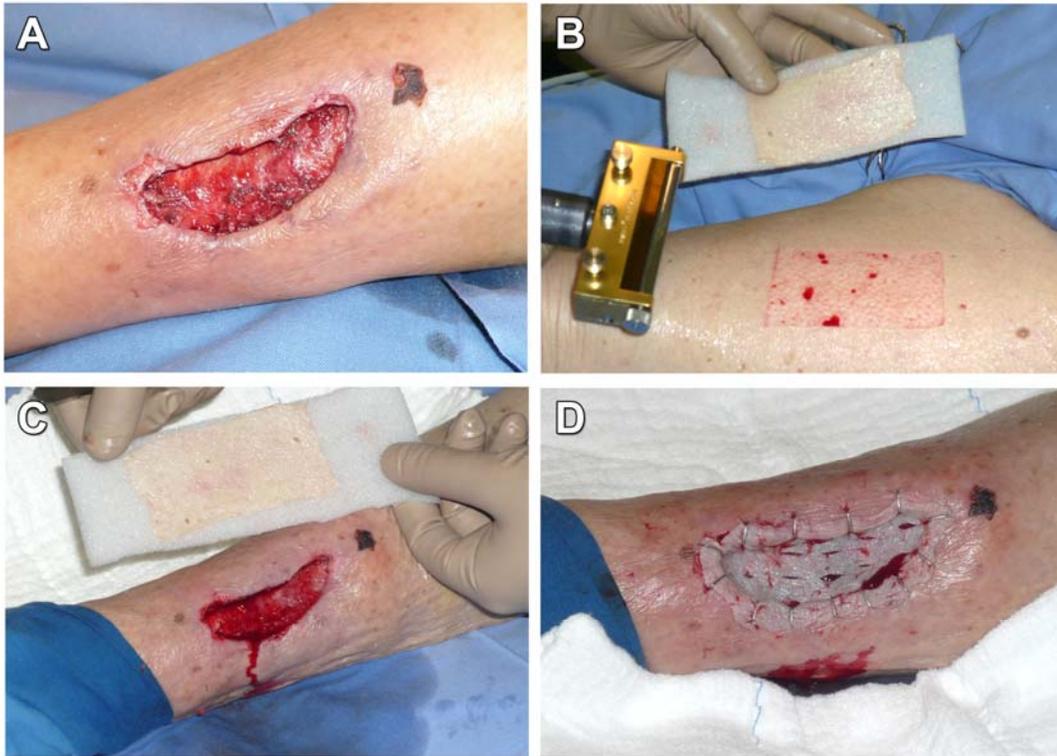


Figura 1. Procedimiento para el injerto dermopedidérmico. (A) Lesión cutánea de espesor total. (B) Toma de injerto desde zona donante sana. (C y D) posicionamiento del injerto en el sitio de lesión.

El uso de **Integra** (Integra Life Sciences Corp., Plainsboro, NJ) ha sido publicado desde el año 1981 para su uso en humanos con quemaduras mayores (Burke et al., 1981). Y el año 1996 fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, USA) para su uso rutinario en quemaduras. Posteriormente se ha extendido el rango de aplicaciones como para la restitución de piel total en resecciones de nevus gigantes, cobertura y protección de tendones y huesos expuestos (Jeng et al. 2007) y para la cobertura en resecciones de cuero cabelludo (Komorowska-Timek et al. 2005). Integra se compone de una matriz de colágeno tipo I de bovino más glicosaminoglicanos de cartílago de tiburón, formando una estructura porosa de 3mm de grosor (figura 2). Este sustituto viene de fábrica con un film de

silicona que lo cubre, de modo que al ser injertado reemplaza por completo la piel. Progresivamente es colonizado por las células locales, se forman nuevos vasos y el colágeno local reemplaza el colágeno de bovino. Una vez que se ha creado y vascularizado la nueva dermis habitualmente entre los 15 a 20 días, es necesario retirar el film de silicona y se requiere adicionar un injerto de piel parcial que proveerá las células epidérmicas para la cobertura definitiva.

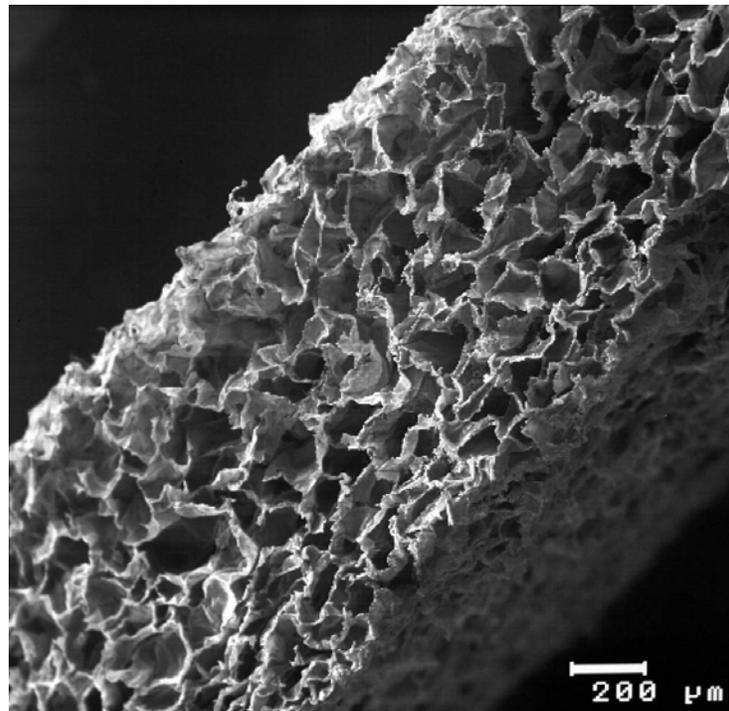


Figura 2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de un segmento de Integra al cual se le ha extraído el film de silicona. Aumento 50x. Se observa una organización tridimensional del colágeno con poros que miden entre 70 y 200 um de diámetro.

Uno de los principales problemas que conlleva el uso este sustituto es la necesidad del segundo tiempo quirúrgico para adicionar las células epidérmicas, mediante un injerto dermoepidérmico autólogo, además de requerir un tiempo de regeneración dérmica prolongado. Es por esta razón que se ha investigado en la posibilidad de crear un mecanismo para que el implante contenga los queratinocitos (Jones et al. 2003, Wood et al. 2007).

No existe un sustituto dérmico ideal y esto es porque se trabaja bajo el concepto de tener una cicatrización adecuada, pero no una “regeneración” del tejido perdido. La piel obtenida luego del injerto de un sustituto dérmico no tiene anexos ni fanereos. Los intentos por regenerar tejidos se han focalizado en el último tiempo en uso de **células madres o troncales**, las cuales además de poseer la capacidad de diferenciarse en múltiples tejidos proveen factores de crecimiento que estimulan al resto de las células locales.

Dentro de los tejidos adultos más estudiados para la obtención de células madres se encuentran la médula ósea y el cordón umbilical, pero la verdad es que casi todos los tejidos poseen células madres de origen mesenquimático, y en la última década se ha descrito la obtención de células troncales a partir el tejido adiposo (**ASCs, Adipose Stem Cells**) con una gran cantidad de células por gramo de grasa procesada (Meruane & Rojas 2010, 2011).

Basados en estos antecedentes y buscando optimizar la cicatrización, hemos desarrollado un modelo experimental, en el cual evaluamos el comportamiento de la cicatrización al adicionar ASCs en una matriz dérmica artificial de Integra®.

IV. Marco teórico

IV.1. Introducción a la medicina regenerativa

La regeneración es la reactivación del desarrollo para restaurar tejidos faltantes. El proceso de regeneración puede ocurrir en múltiples niveles de la organización biológica y la habilidad de los diferentes organismos para regenerar partes faltantes es altamente variable, sin embargo la capacidad de regenerar al menos alguna estructura es común en todos animales (Bely & Nyberg 2010). La regeneración puede darse entonces a nivel celular, de tejido, de órgano, estructura e incluso del cuerpo entero, pero en algunos organismos no se da o es altamente limitada. El proceso de regeneración de extremidades faltantes se ha observado en múltiples organismos, salamandras, cangrejos y estrellas de mar entre otros (Gilbert, 2005), mientras que la regeneración de individuos enteros a partir de pequeños fragmentos se ha observado en planarias y varios cnidarios (Reddien & Sanchez Alvarado, 2004).

El término regeneración ha sido usado para describir un amplio espectro de fenómenos que llevan a la restitución completa de lo perdido, desde elementos celulares (por ejemplo: pérdida de sangre) al reestablecimiento completo un organismo como el caso de la planaria, y una amplia variedad de procesos intermedios. Es muy importante distinguir la regeneración de la reparación y la cicatrización, procesos en los cuales no se restituye por completo lo perdido (Stoick-Cooper et al., 2007).

Hay tres modos principales por medio de los cuales se puede producir la regeneración. El primer mecanismo involucra la desdiferenciación de las estructuras adultas para formar una masa indiferenciada de células que luego llegan a ser reespecificadas. Este tipo de regeneración es denominada **epimorfosis** y es característica de las extremidades en regeneración. El segundo mecanismo es denominado **morfalaxis**. Aquí, la regeneración se produce a través del

restablecimiento del patrón de tejidos existentes y hay poco crecimiento nuevo. Tal regeneración se observa en la hidra y en la planaria. Un tercer tipo de regeneración puede ser pensada como una **regeneración compensatoria**. Aquí, las células se dividen, pero mantienen sus funciones diferenciadas. Ellas producen células semejantes a ellas mismas y no forman una masa de tejido indiferenciado. Este tipo de regeneración es característica del hígado de los mamíferos (Gilbert, 2005).

IV.1.2. Regeneración en planarias

Uno de los organismos en los cuáles el proceso de regeneración ha sido mejor estudiado son las planarias, metazoos que presentan simetría bilateral y pertenecen al Phylum Platyhelminthes (Reddien & Sanchez Alvarado, 2004) Desde hace varios siglos se sabe que cuando estos organismos son cortados por el medio la mitad que tiene la cabeza regenera una cola y la mitad que contiene una cola regenera la cabeza (Figura 3).

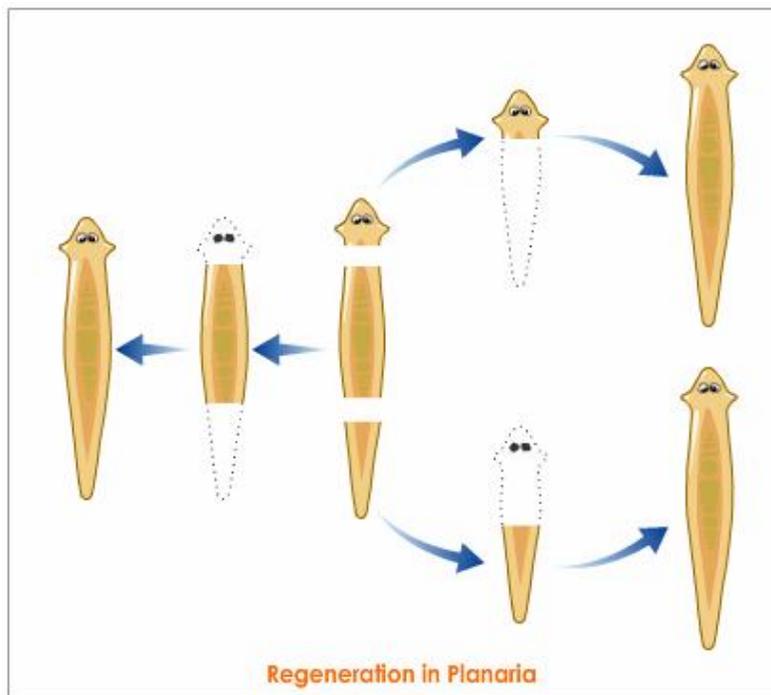


Figura 3. Regeneración en la planaria. Se observa como al ser dividida en 3 partes, tanto el segmento cefálico, como el medio y el caudal pueden originar un nuevo individuo en forma independiente.

Después de un corte una capa delgada de epitelio cubre la herida, las células epiteliales tanto dorsales como ventrales pierden su morfología característica cuando recubren la herida. En animales con amputaciones se detecta un pico de proliferación celular cerca al lugar de la herida, esto lleva a la producción de un brote epitelial/mesenquimal conocido como blastema de regeneración. La proliferación de células observada está restringida a una población de células pequeñas, altamente indiferenciadas, con núcleos grandes y poco citoplasma. Estas células son conocidas como neoblastos (Reddien & Sanchez Alvarado, 2004).

Existen dos hipótesis para la fuente de los neoblastos, por un lado estos podrían provenir de la dediferenciación de células somáticas y por otro lado de la auto-renovación de células madre, la evidencia apunta a que los neoblastos son células madre totipotentes (Reddien & Sanchez Alvarado, 2004).

La regeneración mediante formación de blastema no forma todas las estructuras de la planaria, es el tejido posterior al blastema el encargado de regenerar otras estructuras remodelándose, es decir mediante morfálaxis. El proceso de regeneración en planarias es entonces el resultado de una combinación de los dos principales mecanismos, la epimorfosis y la morfálaxis.

IV.1.3. Regeneración de las extremidades en la salamandra

Cuando una extremidad de salamandra adulto es amputada, las células que quedan son capaces de reconstituir una extremidad completa, con todas sus células diferenciadas organizadas en un orden apropiado. Vale decir, las nuevas células construyen sólo las estructuras ausentes. Por ejemplo, cuando se amputa una muñeca, la salamandra forma una nueva muñeca y no un nuevo codo. De algún modo la extremidad de la salamandra conoce dónde ha sido dañando el eje próximo-distal y es capaz de regenerarse desde este punto en adelante. La salamandra

llevan a cabo este proceso mediante desdiferenciación, proliferación y reespecificación celular, es decir, mediante epimorfosis (Gilbert, 2005).

Después de la amputación entre 6 a 12 horas la células epidérmicas del muñón remanente migran para cubrir la superficie herida. Esta capa de células epiteliales prolifera para constituir el capuchón apical ectodérmico (Figura 4)

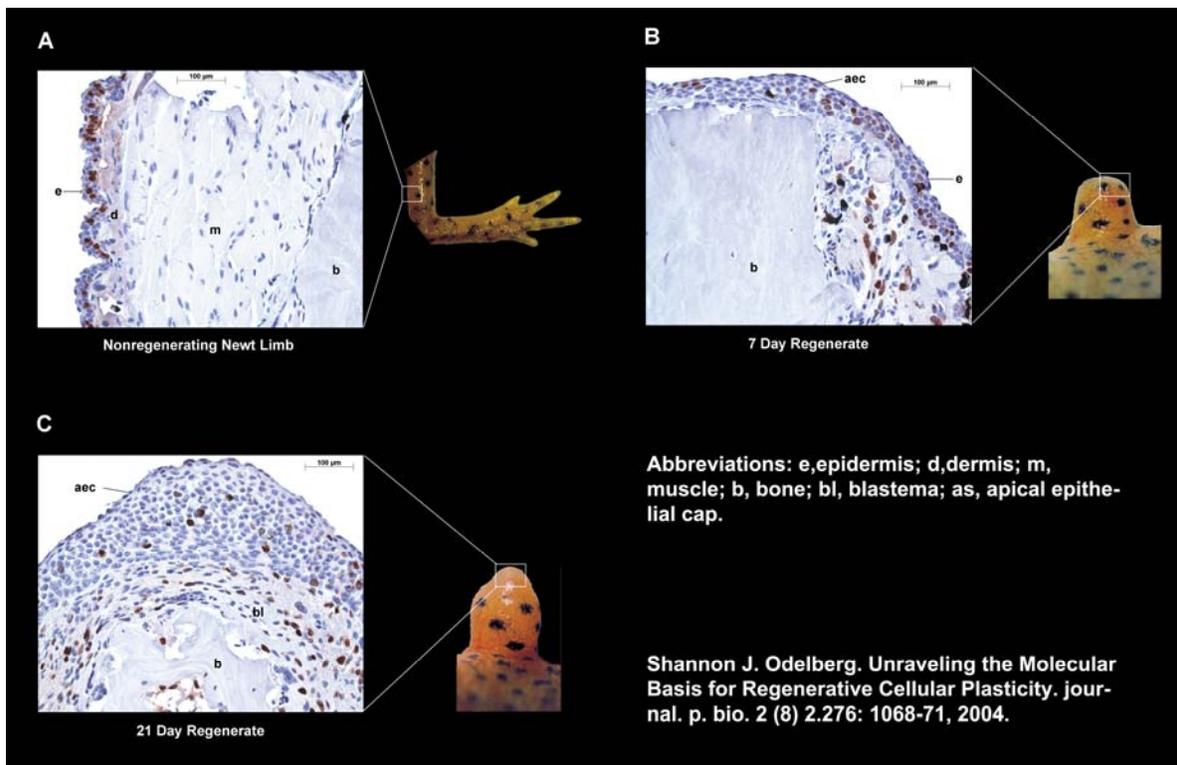


Figura 4. Regeneración de la extremidad en la salamadra.

En contraste con la curación de las heridas en mamíferos, no se forma cicatriz y la dermis no se mueve con la epidermis para cubrir el sitio de amputación.

Durante los siguientes 4 días, las células por debajo del capuchón en desarrollo experimentan una drástica desdiferenciación. Los genes que son expresados en tejidos diferenciados son regulados en menos, mientras que hay un drástico incremento de la expresión de genes tales como *msx1*, que se asocian con con el mesénquima de la zona de progreso de la extremidad embrionaria (Simon el

al., 1995). De este modo las células del muñón forman una masa de proliferación de células indistinguibles, desdiferenciadas justo por debajo del capuchón apical ectodérmico. Esta masa de células desdiferenciadas se denomina **blastema de regeneración** (Figura 4). Estas células continuarán proliferando y finalmente se rediferenciarán para formar las nuevas estructuras de la extremidad (Shannon & Odelberg, 2004).

La proliferación del blastema de regeneración depende de la presencia de nervios. Se piensa que las neuronas liberan factores que incrementan la proliferación. Uno de estos factores es el factor de crecimiento glial, así como también el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2). Además podemos apreciar que la regeneración de la extremidad del anfibio parece ser muy semejante a su desarrollo original. En ambos casos, hay una retroalimentación entre FGF10 producido por el mesénquima y el FGF8 producido en el ectodermo que lo recubre. La condición inicial es la expresión de FGF8 para hacer competente al ectodermo para expresar FGF10 (Gilbert, 2005)

IV.1.4. Regeneración compensatoria en el hígado de mamíferos

En los mamíferos es posible encontrar regeneración compensatoria del hígado. En este caso las partes faltantes no vuelven a crecer, las partes que quedan proliferan para compensar la pérdida del tejido faltante. Es decir que el hígado se regenera por la proliferación de tejido existente que no se desdiferencian completamente, cada tipo de célula mantiene su identidad y no hay formación de blastema. Una de las proteínas más importantes en la regeneración del hígado es el factor de crecimiento de hepatocito (HGF) este es responsable de la inducción de varias proteínas embrionarias (Gilbert, 2005)

IV.1.5. Regeneración aplicada a la medicina

Uno de los objetivos de la medicina regenerativa es identificar las células progenitoras o células troncales, que cuando sean introducidas en un órgano lesionado, puedan estimular la regeneración. Una alternativa a este objetivo es identificar las moléculas que puedan estimular a las células progenitoras del propio organismo a promover la regeneración (Stoick-Cooper et al., 2007).

Mientras aprendemos los mecanismos moleculares de la regeneración, es difícil de entender por qué algunos órganos regeneran bien y otros no. Más aún, por qué las salamandras y peces son capaces de formar blastemas y regenerar estructuras complejas mientras el ser humano no puede. Una creencia común es que la regeneración es mayor en los animales inferiores y menor en los más evolucionados, aunque esta regla tiene muchas excepciones. La habilidad de regenerar es fácil de perder durante la evolución y pensando de ese punto de vista parece razonable asumir que la maquinaria básica necesaria para regenerar aún existe en humanos. Especular sobre la regeneración de un miembro amputado en humanos es un objetivo bastante lejano de la medicina regenerativa, pero la manipulación de varios factores han encontrado mejorar ciertos aspectos de la regeneración (Stoick-Cooper et al., 2007).

En resumen la promesa de la medicina regenerativa es aislar las células troncales, diferenciarlas y hacerlas útiles para ser implantadas en terapias celulares. Una segunda expectativa sería lograr estimular las propias células de individuo con factores de crecimiento sin necesidad de extraerlas. Y una tercera estrategia es lograr el crecimiento de órganos y tejidos *in vitro* para un eventual trasplante a pacientes.

IV.2. Células troncales y pluripotentes

Se denomina célula madre o troncal a una célula indiferenciada capaz de autoreplicarse por largos períodos de tiempo y diferenciarse en un amplio rango de células especializadas dependiendo del medio que la rodea (citoquinas, factores de crecimiento, etc) y su consecuente alteración de la expresión génica. Según su potencial de diferenciación se clasifican como:

Totipotente: Se dice que el huevo fecundado es **totipotente** porque tiene la capacidad de generar un individuo completo junto a sus anexos embrionarios, esta totipotencialidad se mantiene durante las primeras divisiones de segmentación (figura 5). Las blastómeras pierden su totipotencialidad en el momento de la primera diferenciación después de completar 8 blastómeras y se inicia un proceso llamado compactación. Durante este proceso se forman medios de unión entre las blastómeras externas, determinando la constitución de dos poblaciones celulares diferentes. La población externa formará la pared del blastocisto. En cambio, las células que quedan ubicadas internamente originarán al **embrioblasto** llamado también **macizo celular interno (MCI)**. Poco tiempo después se forma una cavidad central formando el blastocisto (figura 6).

Pluripotente: Puede diferenciarse en cualquier tipo de célula de las tres hojas embrionarias, pero no pueden generar un individuo completo, corresponden a las células madres obtenidas del MCI del blastocisto (Figura 6).

Multipotente: Sólo se pueden diferenciar en células de la misma hoja embrionaria. La mayor parte de las células encontradas en los tejidos adultos corresponde a este tipo. Un ejemplo son las células osteoprogenitoras que se pueden diferenciar en células adiposas, cartilagosas u óseas (figura 7)

Unipotentes: Poseen la habilidad de autorrenovación pero sólo se pueden diferenciar en un linaje, un ejemplo de éstas son las células epidérmicas basales (Figura 8).

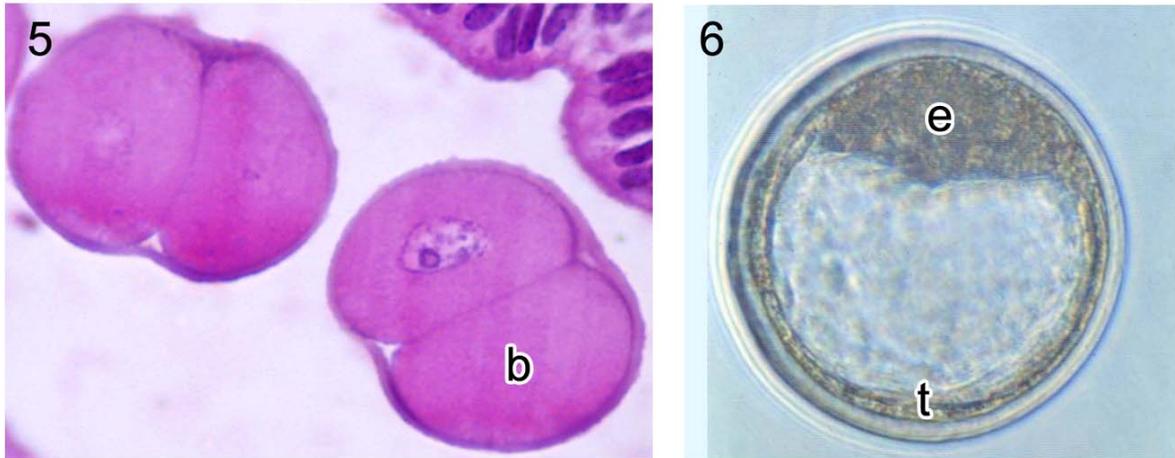


Figura 5 Embriones de ratón, formados por blastómeras totipotentes (b). Figura 6. Blastocisto de ratón constituido por macizo celular interno con sus células pluripotenciales (e) y trofoblasto (t).

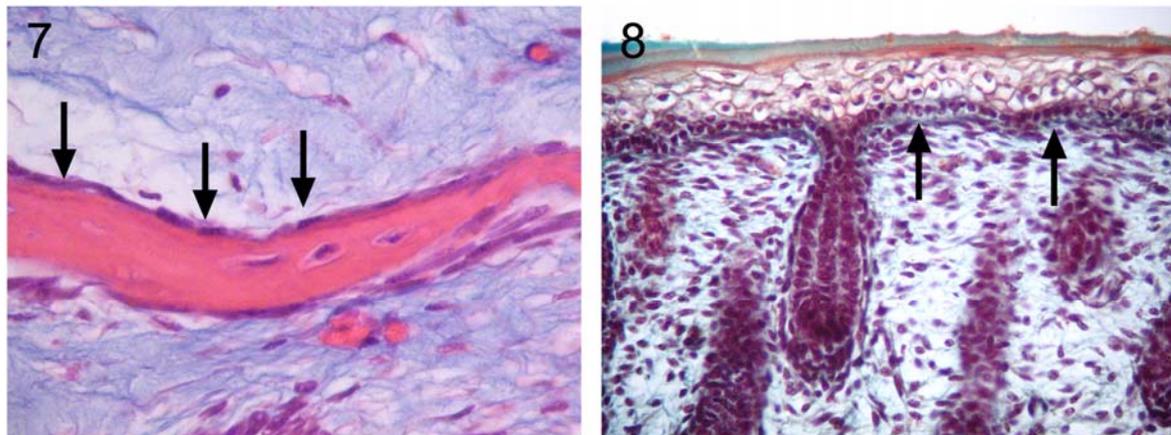


Figura 7. Células osteógenas multipotenciales en cabeza de feto de oveja, H-E Azul de Alcian 400X. Figura 8. Capa basal del epitelio de revestimiento con células unipotenciales Piel de feto de oveja, tricrómico de Masson, 400X.

Si bien las células madres pueden obtenerse a partir de casi todos los tejidos de un individuo y a cualquier edad, con el tiempo se va restringiendo el potencial de diferenciación. Inicialmente un oocito fecundado es totipotente, un blastocisto es pluripotente, luego podemos obtener células desde el cordón umbilical y a partir de tejidos adultos como la médula ósea y tejido adiposo pero éstas son multipotentes, cada vez con capacidad de proliferación y diferenciación más limitada (figura 9).

A las células derivadas del blastocisto las denominaremos células madres embrionarias (*Embryonic Stem Cells, ESCs*) y al resto, células madres adultas. Dentro de las células adultas las que forman parte del mesénquima de los tejidos y no forman elementos hematopoyéticos, las denominaremos Células Madres Mesenquimales (*Mesenchymal stem cells, MSCs*) (figura 9)

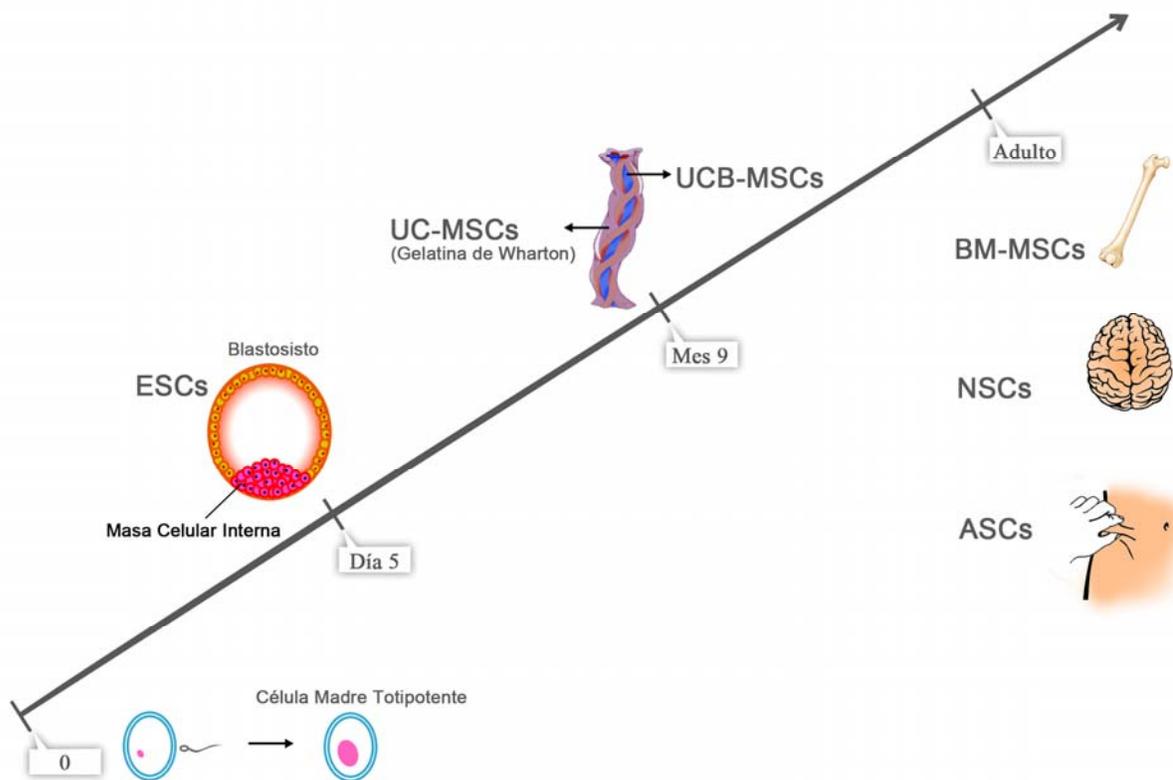


Figura 9. Se muestra a lo largo de la vida de un individuo las diferentes opciones para la obtención de células madres. El oocito fecundado es una fuente de células totipotentes, las células del macizo celular interno (embrioblasto) del blastocisto son las llamadas células madres embrionarias (ESCs), las células de la sangre del

cordón umbilical (UCB) son consideradas células madres adultas jóvenes y el resto obtenidas de otros tejidos son células madres adultas propiamente tal. Células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSCs). NSCs, células troncales neurales. ASCs, células troncales derivadas de células adiposas.

IV.2.1. Células madres embrionarias

Las células madres obtenidas de embriones en la etapa de blastocisto (ESCs) tienen la capacidad para formar todas las células del cuerpo, porque mantienen un cariotipo normal, y una telomerasa altamente activa, además logran en el cultivo, un notable potencial de proliferación durante un largo período de tiempo, dando la posibilidad de una expansión ilimitada.

Las ESCs se obtienen del MCI (embrioblasto) del blastocisto y deben cultivarse “in vitro” para obtener líneas de células pluripotenciales. Estas células madre pueden seguir una de dos rutas: a) mantenerse en un estado indiferenciado, o bien b) diferenciarse en líneas celulares más específicas, por ejemplo cardíacas, neurales, sanguíneas, etc., dependiendo del medio de cultivo que se utilice.

Aún cuando la mayoría de los estudios se han realizado en animales, en 1998 dos laboratorios informaron que habían obtenido células madres de embriones humanos. En estos casos, las células madres fueron obtenidas a partir de células germinales primordiales derivadas de fetos abortados espontáneamente. En ambos casos las células embrionarias fueron pluripotentes, y capaces de proliferar y diferenciarse en el cultivo y también de formar otras células madres que producían neuronas y sangre (Geahart, 1998; Thomson et al. 1998)

Desde entonces varias líneas de ESCs se han obtenido en humanos. Principalmente de oocitos fecundados en fertilización artificial que son desechados. El primer banco de ESCs fue abierto el 2004 en el Reino Unido (<http://www.ukstemcellbank.org.uk>). Se ha establecido también un registro del

número de líneas obtenidas de ESCs en humanos. (<http://stemcells.nih.gov/research/registry/>).

Debido a que estas células pueden proliferar indefinidamente en un medio de cultivo y luego diferenciarse en múltiples tipos celulares, las células humanas potencialmente pueden proveer de un aporte ilimitado de tejidos para trasplantes humanos. La terapia de trasplante basado en estas células, es una promesa de tratamiento exitoso para una variedad de enfermedades como Parkinson, diabetes, alteraciones cardíacas, alteraciones degenerativas del cerebro o lesiones de la médula espinal, y también para producir nuevas células sanguíneas en personas con anemia; sin embargo aun hay barreras que superar para un tratamiento clínico exitoso, principalmente debido a la presencia de anomalías cariotípicas en algunos cultivos y a la eventual producción de teratomas (Mitalipova et al. 2005). A la fecha no hay ningún tratamiento médico aprobado con el uso de ESCs. Recientemente la FDA ha autorizado un estudio multicéntrico de fase I en pacientes con lesión de médula espinal, realizado por la compañía biotecnológica Geron. Posiblemente si se demuestra seguridad en estos estudios se iniciarán otros.

También se ha desarrollado la idea de clonar un embrión temprano a partir de las células somáticas del paciente y así generar sus propias células madre. French et al. (2008) obtuvieron un blastocisto humano posterior a la transferencia nuclear de un fibroblasto en un oocito, esto se denomina transferencia nuclear celular somática (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT). El resultado es un grupo de células pluripotentes idénticas genéticamente al dador de fibroblastos, el procedimiento se conoce también como clonación terapéutica. Las desventajas de esta técnica es que son muy laboriosas e intensivas, dañinas para la célula y muy ineficientes; además se requiere una gran cantidad de oocitos (figura 10).

IV.2.2. Reprogramación celular

Se define la reprogramación celular como la adquisición de características de célula troncal embrionaria. Estas células se definen por dos capacidades esenciales: la pluripotencialidad, que es la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares. La otra característica es la capacidad de autorrenovarse. Esto se logra mediante una división mitótica asimétrica, conservando una de las células hijas las características de su madre, es decir sigue siendo célula troncal, y la otra adquiere nuevas características que la van diferenciando hacia un cierto linaje celular. La primera se mantiene siempre en el ciclo celular con una capacidad de generar una progenie en forma indefinida, la segunda en algún momento de su ontogenia pasa a G_0 . Utilizando estos criterios de reprogramación se pudo reproducir los resultados de la transferencia nuclear mediante técnicas que se fueron desarrollando sucesivamente a medida que los avances de la biología molecular lo permitieron.

Un avance en la reprogramación celular es la creación de células madres pluripotentes inducidas (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs), publicada en el año 2006 por Takahashi & Yamanaka. Estas células se generan mediante la reprogramación de células somáticas por la introducción de factores de transcripción a través de retrovirus (figura 10). Los genes introducidos son el Oct4, Sox2 y c-Myc con Klf4 o Nanog con Lin28. Los dos primeros son factores de transcripción específicos de células troncales asociados a pluripotencialidad. Los dos últimos son factores de transcripción oncogénicos u oncogenes. De estos genes el Oct4 resulta ser el más importante, el cual no puede ser sustituido. Las características son similares a las ESCs en cuanto a la morfología, marcadores de superficie y actividad de telomerasa. Uno de los principales problemas en su utilización es la baja eficiencia de reprogramación que va del 0.1 al 0.001% de éxito, también pueden generar teratomas y activar oncogenes. Al igual que las ESCs se han realizado múltiples ensayos en animales pero no se ha autorizado su uso terapéutico en humanos.

Al menos una compañía biotecnológica (iPierian) ha sido fundada para explotar comercialmente esta tecnología y el gobierno Japonés ha creado un instituto dedicado al tema (Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University). Claramente las expectativas respecto al tema son altas (Sipp, 2010).

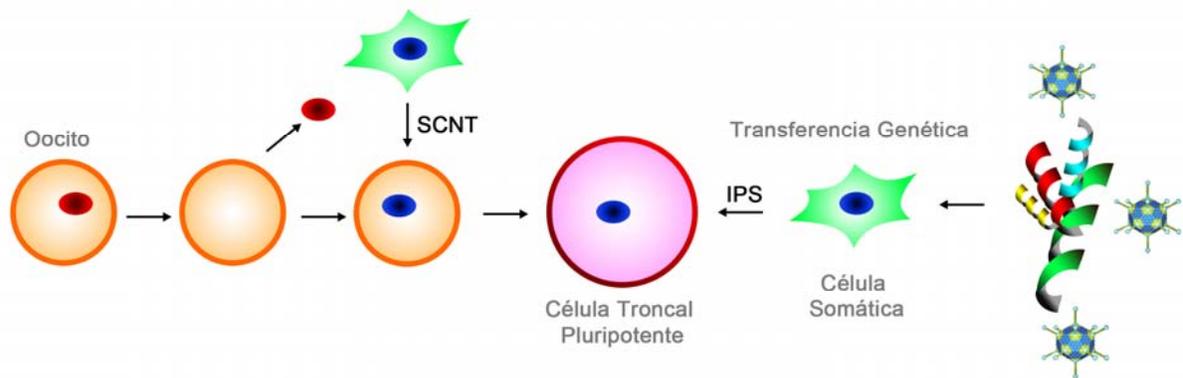


Figura 10. Se muestran dos maneras para obtener células madres pluripotentes a partir de células somáticas. A la izquierda el procedimiento de transferencia celular nuclear somática (Somatic cell nuclear transfer, SCNT) y a la derecha el procedimiento de inducción por transfección viral (induced Pluripotent Stem Cell, iPSC)

IV.2.3. Células madres adultas

Los tejidos ya especializados están compuestos principalmente de células ya restringidas en su potencial de diferenciación, pero en su evolución los organismos han incorporado también células madres somáticas adultas en los tejidos con el fin de renovar y reparar en condiciones fisiológicas y patológicas.

IV.2.3.1. Células madres de la médula ósea

Durante varios años se consideró la célula madre hematopoyética como la única célula en la médula ósea con capacidad generativa y se pensaba que sólo era multipotencial. Sin embargo hoy se sabe que la composición de la médula ósea es más compleja, pues en ella se han identificado un grupo heterogéneo de células madres adultas compuesto por las células hematopoyéticas (hematopoietic stem cells, HSC), población lateral, células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) y las células mesenquimales (Mesenchymal stem cells, MSCs).

Las células madres hematopoyéticas se han utilizado desde hace más de 50 años en el trasplante de médula ósea y han demostrado su efectividad en el tratamiento de diversas enfermedades como leucemias y mielomas. En humanos el fenotipo de superficie es $lin^- CD34^+ CD38^+ CD133^+ c\text{-Kit}/CD117^+ CD59^+ Thy1/CD90^+ CXCR4^+$ y se diferencian clásicamente en linajes mieloides y linfoides.

Las células madres mesenquimáticas derivadas de la médula ósea (BM-MSCs) son otro tipo de célula adulta multipotente capaz de diferenciarse en todos los linajes mesodérmicos y son similares a las aisladas en otros órganos. Si bien han sido descritas en la última década (Bianco et al., 2001), se atribuye a Friedenstein et al. (1974) su descubrimiento al describir estas células como precursores de fibroblastos presentes en la médula ósea. Su potencialidad y características serán descritas en conjunto con el resto de las MSCs.

IV.2.3.2. Células madres del cordón umbilical

Otra fuente de células madres es la sangre que fluye por el cordón umbilical, En un ml de sangre del cordón umbilical hay aproximadamente 8000 progenitores de eritrocitos, entre 13 y 24 mil progenitores mieloides, y entre 1000 y 10.000 células madres pluripotenciales. Se las considera células madres adultas “jóvenes”, dentro de sus ventajas destaca que tienen telómeros más largos, alto potencial de

proliferación, reducción del riesgo de contaminación viral y mejor tolerancia al antígeno de histocompatibilidad HLA (Gilmore et al., 2000). Los marcadores de superficie más frecuentes incluyen el CD7 CD34 CD38 CD90 y CD133 (McGuckin et al., 2003). Esta forma de obtención de células madres estaría mucho más de acuerdo con diversas regulaciones éticas. En octubre de 19 se realizó el primer trasplante de células madres de sangre del cordón umbilical (Umbilical Cord Blood Stem Cells UCB-SCs) a la médula ósea, a pesar del escepticismo de científicos y clínicos, desde entonces se han convertido en una fuente común para trasplante alogénico. Al año 2010 se estima que 600.000 unidades de UCB han sido almacenadas en bancos y unas 20.000 unidades han sido utilizadas para trasplantes en adultos y niños con enfermedades malignas y no malignas con buenos resultados (Wagner et al, 2010). Actualmente hay varios bancos para almacenar UCB, y muchos padres tienen la opción de congelar un UCB de sus hijos y mantenerlos allí hasta el momento en que ellos pudieran necesitar algún trasplante de células.

IV.2.3.3. Células madres de otros tejidos adultos

Denominaremos célula madre mesenquimal (MSC) a un tipo de célula madre adulta presente en casi todos los tejidos conectivos adultos principalmente de origen mesodérmico destinada a regenerar y reparar (Young et al., 2002). Se las ha descrito formando parte de la médula ósea (BM-MSCs), en la gelatina de Wharton del cordón umbilical, en el tejido adiposo (Zuk et al., 2001) (Adipose Derived Stem Cells, ASCs) y en el tejido nervioso, entre otros.

La utilización de MSCs con fines regenerativos y en enfermedades inmunológicas va en aumento, ante lo cual es necesario citar los criterios de Gimble et al. (2007) quien sugiere que cualidades debe tener una célula troncal para se utilizadas con fines médicos, estas son:

1. Presencia en cantidades muy abundantes (millones a billones de células)
2. Aislables con procedimientos mínimamente invasivos.
3. Diferenciables en múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible.
4. Transplantables en forma autóloga o alogénica.
5. Manipulables de acuerdo a las actuales Guías de Buena Práctica.

IV.3. Células troncales derivadas del tejido adiposo

El tejido adiposo posee la habilidad de cambiar de volumen durante la vida de un individuo, los cambios menores son por hipertrofia celular, pero los cambios mayores son mediados por hiperplasia y aumento de la vascularización. Estos cambios están mediados por una población de células troncales multipotentes con propiedades similares a las obtenidas desde la médula ósea (Fraser et al., 2006). A las células troncales obtenidas del tejido adiposo las denominaremos **ASCs (Adipose-derived Stem Cells)**.

Claramente las ASCs cumplen los criterios de Glimble et al. Considerando la incidencia de obesidad en la población actual, esta es una fuente realmente abundante y accesible. El tejido adiposo puede ser obtenido mediante lipoaspiración en grandes cantidades y con riesgo mínimo. La lipoaspiración es el 3° procedimiento que con mayor frecuencia realizan los cirujanos plásticos en Norteamérica (ASPS 2007). Según datos desde 1994 al año 2000 se han reportado 0 muertes en 66570 procedimientos y complicaciones serias en 0.68 por 1000 casos (Housman et al., 2002). Con anestesia local se pueden obtener hasta 200 grs. de tejido. 1 gr. de tejido adiposo contiene 5×10^3 ASCs, aproximadamente 500 veces más que 1 gr. médula ósea (Fraser et al.).

IV.3.1. Consideraciones del tejido adiposo.

El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica del embrión y tiene desarrollo pre y post natal. La formación de células adiposas en la especie humana tiene lugar durante el segundo trimestre de gestación (Ailhaud & Grimaldi, 1992). Se caracterizan por su aspecto fibroblástico que contiene abundante retículo endoplasmático, un alto índice núcleo/citoplasma, localización perinuclear de la mitocondria y la presencia de vacuolas lipídicas (Gimble et al.). Su diferenciación celular procede de la secuencia adipoblasto → Preadipocito → Adipocito inmaduro → adipocito maduro (Figura 11). En el tejido adiposo los precursores

coexisten en conjunto con células adiposas maduras, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales indiferenciadas y pobremente diferenciadas, que hoy llamamos MSCs (Ailhaud & Grimaldi). Probablemente el progenitor de los adipocitos ha venido desde la médula ósea a través de la circulación (Hausman & Hausman, 2006).

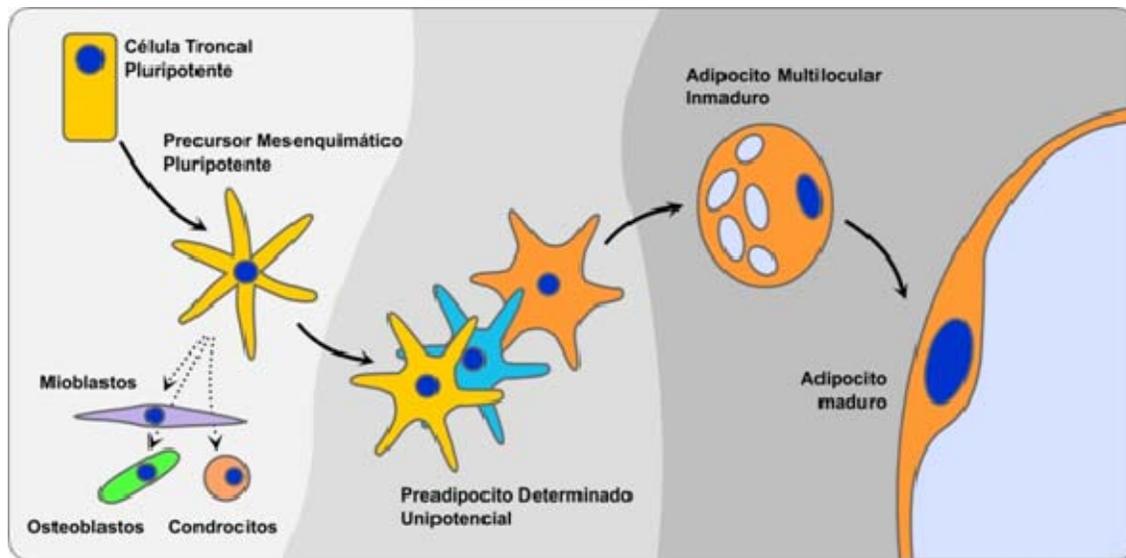


Figura 11. Secuencia de diferenciación del adipocito. El precursor mesenquimático es pluripotente, se encuentra en el tejido adiposo adulto y puede diferenciarse en otro linaje mesodérmico.

Macroscópicamente se distinguen 5 tipos de tejido adiposo: de la médula ósea, de la grasa parda, de la grasa blanca, el mamario y el de soporte mecánico.

El de la médula ósea ocupa el espacio no necesario para la hematopoyesis. El tejido pardo es muy termogénico, rodea órganos mayores durante en el recién nacido para luego desaparecer en el adulto. El tejido graso mamario provee nutrientes y energía durante la lactancia y es regulado por hormonas del embarazo. El tejido adiposo de soporte mecánico se encuentra en la grasa orbitaria y en palma de mano, planta de pies, no presenta mayores cambios ante la influencia o hormonal. Por último el tejido adiposo blanco provee energía y aislamiento, es reconocido actualmente como un órgano endocrino que secreta adiponectina, leptina y otras

adipokinas con efectos fisiológicos y es el que presenta mayores cambios en volumen a lo largo de la vida (Gimble et al.).

El procedimiento de lipoaspiración se realiza a nivel del tejido blanco del tronco y extremidades, la abundancia celular así como su capacidad proliferativa presenta datos contradictorios. Según Almeida et al. (2008). las áreas del tronco presentan un 22% más de ASCs que las extremidades. Shipper et al. (2008), que evalúan la capacidad proliferativa celular, encuentran que ésta es igualmente alta en todos los depósitos grasos de pacientes jóvenes a diferencia de pacientes de edad avanzada donde es mayor en extremidades.

IV.3.2. Técnica de obtención y cultivo de células troncales procedentes de lipoaspirado humano

El paciente puede ser anestesiado con anestesia general, regional o local. El tejido adiposo puede ser obtenido por resección quirúrgica, por lipoaspiración tumescente o lipoaspiración ultrasónica. En el caso de la técnica tumescente la infiltración del tejido adiposo se realiza con solución fisiológica más epinefrina en concentración de 1mg/1000ml y si se requiere además anestesia local la concentración de lidocaína a utilizar es de 400mg/1000ml (Hoppmann et al, 2009).

Las muestras de tejido adiposo son obtenidas mediante cánulas de lipoaspiración conectadas a presión negativa entre -400 a -600 mmHg (Figura 12). Este procedimiento genera fragmentos de tejido cuyo tamaño varían dependiendo del grosor de la cánula, no se altera significativamente la viabilidad celular. Se transportan en frascos de 50cc a 4°C hasta su procesamiento según la técnica descrita por Zuk et al.

Se lava la muestra con solución buffer-fosfato (PBS) en igual cantidad, agitación, eliminación de las células hemáticas, solución salina y anestésico local, obtención de la fracción estromal. Digestión de la matriz extracelular con Colagenasa

Il al 0,075% por 30 minutos a 37°C. Inactivación de la enzima con igual volumen de medio de cultivo. Centrifugación de la muestra a 1200 g por 10 minutos, se obtiene precipitado de alta densidad. El pellet obtenido es resuspendido en medio de cultivo y puesto en placas Falcon® de 100 mm. El medio de cultivo se compone de DMEM + 10% FBS + Penicilina-estreptomicina-anfotericina B y glutamina 100UI/ml. Se mantiene a 37°C y 5% de CO₂ (Figura 13). Se lava a las 24 hrs con PBS para eliminar las células no adherentes al plástico. Se mantiene en el incubador con cambio del medio 2 veces a la semana. Entre el 5° a 7° día se obtiene confluencia (Figura 14 y 15), luego se realiza tripsinización para pasar al segundo pasaje (Meruane et al., 2009, 2010, 2011)

Recolección en frasco



Recolección con jeringa



Figura 12. Proceso de lipoaspiración. A la izquierda se observa la recolección del tejido adiposo aspirado en frasco conectado directamente a la aspiración central del pabellón. A la derecha se observa la recolección con jeringa conectada a la cánula.



Figura 3.

Figura 13. Técnica de obtención de las células troncales desde tejido lipoaspirado humano. El tejido adiposo aspirado se compone de una fracción estromal que es digerida con collagenasa para luego ser centrifugada, obteniendo un pellet alto en ASCs que es cultivado.

El tiempo de doblaje celular es entre 2 a 4 días dependiendo del medio de cultivo y el pasaje en que se encuentre (Mitchell & McIntosh, 2006). Si comparamos la capacidad proliferativa las BM-MSCs llegan hasta el pasaje N° 15 mientras las las ASCs llegan a sobrepasar el pasaje N°20 (Lee et al., 2004). Con pasajes prologados por más de 4 meses, se ha observado que las ASCs pueden ir a la transformación maligna, al menos en 1 reporte se ha demostrado anomalías cariotípicas con frecuencia > a 30% y cuando son implantadas en una rata inmunodeficiente se forman tumores hasta en 50% (Rubio et al., 2005). Estos resultados nos indican que la manipulación de ASCs debe ser con cautela.

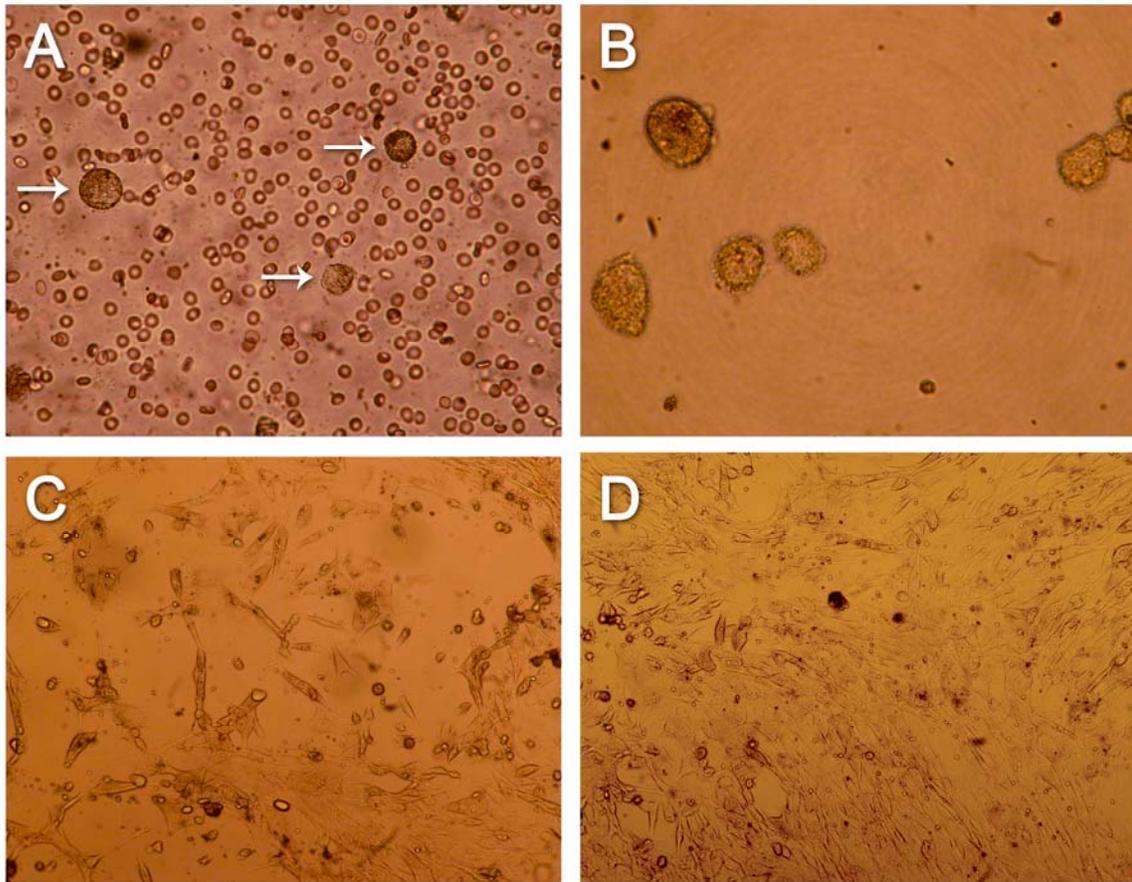


Figura 14. Cultivo de ASCs humanas obtenidas a partir de lipoaspirado procesado. Visión directa de la placa de cultivo en microscopio invertido. (A) Primer día de siembra del pellet, se observan las ASCs con forma esférica (flechas) en conjunto con abundantes glóbulos rojos. (B) Se observan las ASCs en primer día, luego de trypsinización, iniciando la segunda fase. (C) 2° día de cultivo, se visualizan células de aspecto fibroblástico y algunas vacuolas de material lipídico en el medio de cultivo. (D) 6° día de cultivo, se observa confluencia celular. Aumento 400x (A y B) y 200x (C y D).

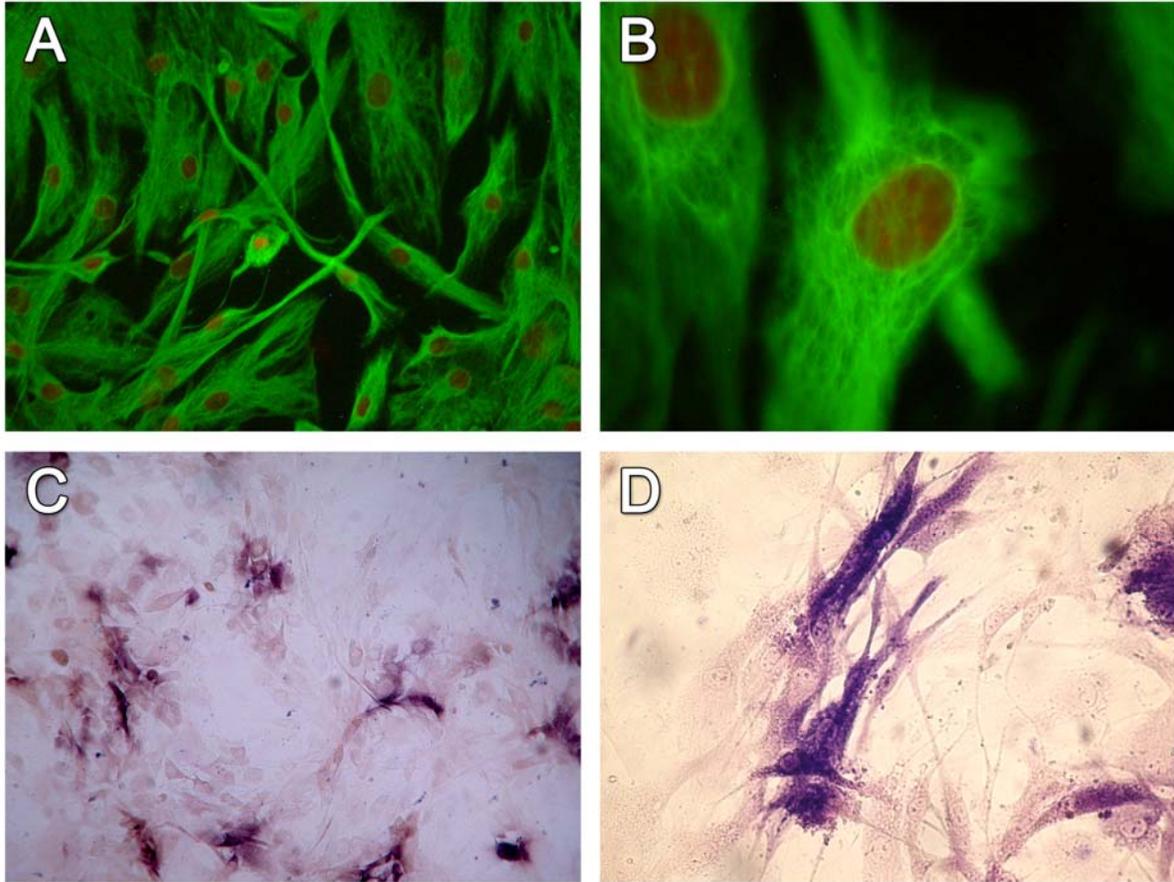


Figura 15. Cultivo de ASCs humanas en segundo pasaje, 4° día. (A y B) Inmunotinción de fluorescencia doble. Los núcleos se encuentran teñidos con propidio y los filamentos intermedios con anticuerpo antivimentina-FITC, lo cual demuestra su origen mesenquimático. Aumento 200x (A) y 1000x (B). (C y D) Tinción con fosfatasa alcalina BCIP/NBT fuertemente positiva, lo cual demuestra su carácter indiferenciado. Aumento 100x (C) y 400x (D).

IV.3.3. Nomenclatura a utilizar, Criterios para definir célula multipotencial, características moleculares.

En el año 2000 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) concluye que el término “célula troncal” para denominar a estas células adherentes al plástico no tiene mucho soporte, si bien el término MSCs (mesenchymal stem cells) está arraigado en todos los científicos del área, se sugiere utilizar el término “Células Estromales Mesenquimáticas Multipotentes”, se puede seguir utilizando el acrónimo MSCs pero con este concepto detrás (Horwitz et al., 2005). Según esto el término correcto para las células troncales derivadas del tejido adiposo es “células estromales derivadas del tejido adiposo” (ADSCs) pero lo más común actualmente es denominarlas ASCs como acrónimo y BM-MSCs a las células troncales derivadas de la médula ósea, aunque a estas últimas se les sigue denominando MSCs en forma genérica.

La ISCT ha establecido criterios para poder denominar a una célula como MSC. Primero las MSC deben ser adherentes al plástico en condiciones de cultivo estándar. Segundo, $\geq 95\%$ de las MSC medido por citometría de flujo debe expresar CD105, CD73 y CD90 y perder la expresión ($\leq 2\%$ positivo) para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA clase II. Tercero estas células deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipositos y condroblastos en condiciones de cultivo estándar (Dominine et al., 2006) (Tabla I).

Tabla I. Criterios para Identificar MSC (Dominici el al., 2006).

Criterios		
1. Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar		
2. Fenotipo	Positivo ($\geq 95\%$)	Negativo ($\leq 2\%$)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 o CD11b
		CD79 α o CD19
		HLA-DR
3. Diferenciación in Vitro: osteoblastos, adipositos, condroblastos (demostrado por tinción del cultivo celular)		

Los inmunofenotipos celulares de superficie tales como los marcadores CD (determinados por citometría de flujo) han sido investigados por varios autores. Comparando la expresión de marcadores en ASCs v/s BM-MSCs v/s UCB-MSCs (umbilical cord blood) más del 90% expresan CD44, CD73, CD29, CD90 y HLA I y ninguno expresa el HLA II. Una de las principales controversias es la expresión de CD34 el cual es un marcador ampliamente utilizado para células troncales hematopoyéticas que se describe casi ausente en las ASCs (Lee et al.; Kern et al., 2006), Según Mitchell et al. lo expresan en más del 60% antes pasaje N°4 para luego perderse casi por completo (Mitchel & McIntosh).

Al igual que las BM-MSCs las ASCs se las considera inmunoprivilegiadas no sólo por el hecho de carecer de HLA II, sino porque tienen la habilidad de suprimir la reacción linfocítica mixta, en consecuencia se las puede injertar en forma alogénica (Puissant et al., 2005; Uccelli et al., 2007).

Una de las propiedades funcionales de las ASCs es que no sólo poseen la capacidad de multidiferenciación, sino que además secretan potentes factores de crecimiento como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y factor de crecimiento símil a la insulina, especialmente en respuesta a la hipoxia (Rehman et al., 2004) y al factor de necrosis tumoral- α mediado por un mecanismo dependiente de proteína kinasa p38 (Wang et al., 2006).

Para una mayor caracterización de las MSCs v/s fibroblastos, ya que su aspecto morfológico es muy similar, se ha analizado la expresión genética global encontrándose 25 genes (incluyendo fibronectina, ECM2, ID1, NFIB, HOXA5 y HOXB6) con sobreexpresión en el grupo de MSCs (Wagner et al., 2005). Comparando ASCs v/s BM-MSCs menos del 1% de los genes tiene diferente expresión (Lee et al., 2004).

IV.3.4 Capacidad de diferenciación de las ASCs.

Las ASCs tienen la capacidad de diferenciarse en células de origen mesodérmico como adipocitos (Zuk et al), fibroblastos, miocitos (Mizuno et al., 2002), osteocitos (Zuk et al.; Halvorsen et al., 2001; Hicok et al., 2004) y condrocitos (Zuk et al.; Erickson et al., 2002), proceso denominado diferenciación linaje-específica. Dentro de estos tipos celulares mesodérmicos el proceso de diferenciación puede cambiar por ejemplo por sobreexpresión de un factor de transcripción específico de cada linaje. Así la sobreexpresión de PPAR γ en fibroblastos o miocitos resulta en diferenciación adipogénica. Este proceso es denominado “transdiferenciación” (Hong & Yaffe, 2006). Llama la atención que las ASCs no sólo tienen el potencial de diferenciarse en células y tejidos de origen mesodérmico. Cada vez hay más evidencia de la capacidad de las ASCs para diferenciarse en tejidos de origen distinto como neuronas (Safford et al., 2002; Ashjian et al., 2003), células pancreáticas endocrinas (Timper et al., 2006; Lee et al., 2008), hepatocitos (Seo et al, 2005), células endoteliales (Miranville et al., 2004; Cao et al., 2005), cardiomiocitos (Planat-Benard et al., 2004) y células epiteliales (Brzoska et al., 2006). A este proceso Shäffler et al. (2007) le han denominado “diferenciación cruzada”.

Los factores de transcripción y los eventos moleculares que llevan a la diferenciación en cualquier linaje mesodérmico son bien conocidos (Shäffler et al)(tablaIII). Sin embargo, previo a que la diferenciación ocurra, la célula troncal debe ser asignada a cierto linaje, Hong et al (2006) han descrito un coactivador de transcripción denominado “TAZ” que funciona como un “modulador molecular” al activar un factor e inhibir a otro simultáneamente, así puede determinar la diferenciación de una célula hacia la línea ósea o adiposa en forma excluyente.

En la tabla II se representan las diferentes líneas de diferenciación publicadas hasta el momento, así como la composición de los medios de cultivo y factores de crecimiento respectivos. Además en la tabla III mencionamos los genes y factores de

transcripción relacionados con los 4 linajes mesodérmicos básicos así como sus marcadores y tinciones específicas.

Tabla II. Potencial de Diferenciación y Factores Asociados

Tipo de Diferenciación	Factor Inductivo	Referencia
Adiposo	Dexametasona, IBMX, Indometacina, Insulina, Tiazolidona	Zuk et al., 2001.
Óseo	Ácido ascórbico, BMP-2, dexametasona, 1,25(OH) ₂ D ₃	Halvorsen et al., 2001; Hicok et al., 2004.
Cartilaginoso	Ácido ascórbico, BMP-6, BMP-7, FGF-2, TGF-β ₁ , TGF-β ₂ , TGF-β ₃ , dexametasona, IGF1, insulina.	Schäffler et al., 2007; Erickson et al., 2002; Estes et al., 2006.
Muscular	Dexametasona, suero equino	Mizuno et al., 2002.
Cardiomuscular	Transferrina, IL-3, IL-6, VEGF	Planat-Bénard et al., 2004.
Endotelial	Medio especial (EGM-2-MV; Cambrex), Ac. Ascórbico, EGF, bFGF, hidrocortizona	Miranville et al., 2004; Cao et al., 2005.
Neuronal	Hidroxinisolona, Ácido valproico, Insulina	Safford et al., 2002, Ashjian et al., 2003
Pancreático	activina-A, exendina-4, HGF, pentagastrina	Timper et al., 2006; Lee et al., 2008.
Hepático	HGF, Oncostatina M y dimetil-sulfóxido	Seo et al., 2005.
Epitelial	Ácido trans-retinoico	Brzoska et al., 2006.

Tabla III. Linajes mesodérmicos, tinciones y genes implicados.

	Determinante específico del linaje	Tinciones histológicas/ inmunohistoquímicas	Facores de transcripción, de crecimiento, kinasas.
Adipogénica	Acumulación lipídica	Rojo oleoso	PPAR γ /RXR α C/EBP α,β,δ ADD1/SREBP1c KROX-20, KLF-5
Osteogénica	Actividad Fosfatasa Alcalina, Producción de matriz calcificada	Fosfatasa Alcalina, Von Kossa	Runx-2, Tbx-3 BMP-2, Notch-1 Osx, Dix5, Msx2 Menin, Shh
Condrogénica	Matriz de proteoglicanos sulfatados, Síntesis de Colágeno tipo II	Azul alcian, Anticuerpo monoclonal para colágeno II	BMP-4,-6,-7 FGF-2, TGF β Sox-9 Brachyury
Miogénica	Multinucleación, Expresión de MyoD1	Anticuerpos monoclonales para Miosina y MyoD1.	MyoD, Myf5, Miogenina MRF4, MEF2 Pax-3, Pax-7

Diferenciación Adipogénica: Las ASCs poseen la capacidad de diferenciarse en linaje adiposo con todas sus características funcionales tales como actividad lipolítica ante la estimulación con catecolaminas, secreción de adiponectina y leptina (Dicker et al., 2005). Se ha regenerado nuevo tejido adiposo en ratas mediante la inyección de esferas que incluyen ASCs diferenciadas (Choi et al., 2005). La capacidad de diferenciación en este linaje es de un 100% para ASCs v/s 94% para BM-MSCs v/s 0% de UCB-MSCs (Kern et al.). El futuro de la regeneración de tejido adiposo será restituir la morfología de partes blandas.

Diferenciación Osteogénica: En el medio de cultivo adecuado y utilizando una matriz extracelular artificial se obtiene una diferenciación bastante exitosa. Las células generadas poseen la capacidad mecanosensitiva similar al hueso (Knippenberg et al., 2005). Las ASCs tratadas con BMP-2 recombinante se diferencian a la línea ósea

rápidamente (Dragoo et al., 2003). Cui et al. (2007) evaluaron el uso de ASCs en una matriz de coral para reparar un defecto craneal de 2x2 cm en un modelo canino con 84% de cicatrización v/s un 25% en el control con un seguimiento de 2 años.

Diferenciación Condrogénica: Adicional al medio de cultivo que describe Zuk et al. con TGF- β 1 la adición de BMP-4, BMP-6, BMP-7 inducen la diferenciación (Shäffler et al.). Se describen diferencias en la capacidad de diferenciación de ASCs v/s BM-MSCs, pero éstas se deberían sólo a un menor tiempo de cultivo (Fraser et al., 2005).

Diferenciación Miogénica: Luego que Mizumo et al. (2002) describiera que las ASCs en medio suplementado con hidrocortisona más dexametasona formaba células multinucleadas con miofibrilos después de 3 semanas, se han generado varios estudios preclínicos dentro de los cuales cabe destacar el de Bacau et al. (2004) que inyecta células diferenciadas al 3° día en músculo tibial anterior lesionado con mejoría mayor que el control. Rodríguez et al. (2005) reporta la regeneración muscular en un modelo de ratas mdx (ratas con distrofia muscular de Duchenne).

Diferenciación cardiogénica: Las ASCs cultivadas en medio de metilcelulosa semisólida con IL-3 (interleuquina-3), IL-6 más VEGF diferencian células con actividad marcapaso, expresión genética específica de células cardíacas y capacidad de responder a estímulos colinérgicos y adrenérgicos (Planat-Bénard et al., 2004). En modelos de ratas la inyección intraventricular de ASCs posterior e isquemia miocárdica aguda logra una mejora en la función ventricular a las 12 semanas de seguimiento, eso si sin aumentar significativamente la masa muscular (Schenke-Layland et al., 2009).

Diferenciación endotelial: El potencial proangiogénico parte del hecho que estas células liberan VEGF, HGF, FGF-2, TGF- β (Rechman et al., 2004; Wang et al., 2006; Lu et al., 2008). Esto las hace utilizables para la terapia regenerativa celular y para tratar los problemas relacionados con la isquemia reperfusión (Miranville et

al.; Cao et al.). Al administrar VEGF *in Vitro* se expresan los marcadores endoteliales. Lu et al. (2008) demuestra en un modelo de colgajos en ratas que la viabilidad de éstos aumenta con la inyección de ASCs, posteriormente Uysal et al. (2009) nos muestra el mismo modelo de colgajo sometido esta vez a isquemia/reperfusión con aumento en la viabilidad del colgajo en más de un 40% así como los factores de crecimiento vasculares asociados.

Diferenciación Neurogénica: Kang et al. (2003) realiza un estudio con ASCs humanas diferenciadas en células neuronales e inyectadas en un modelo experimental de isquemia cerebral en ratas con resultados positivos, mejorando déficit funcionales.

Diferenciación Pancreática: Timper et al (2006) obtiene diferenciación pancreática *in Vitro* de ASCs al adicionar los factores de diferenciación activina-A, exendina-4, HGF y pentagastrina. Las células diferenciadas logran producir insulina, glucagón y somatostatina. Lee et al. (2008) obtiene resultados similares añadiendo al cultivo de ASCs “extracto de páncreas”.

Diferenciación Hepática: Seo et al. (2005) trata ASCs con HGF, Oncostatina M y dimetil-sulfóxido obteniendo una línea que produce albumina y α -fetoproteína. Adicionalmente estas células poseen la habilidad de depurar lipoproteínas de baja densidad y producir urea. Kim et al. (2003) administra ASCs en forma endovenosa a ratas después de una hepatectomía parcial obteniendo integración hepática de éstas.

Diferenciación Epitelial: la diferenciación queratinocítica es inducida por ácido trans-retinoico en una dosis que no inhiba la proliferación excesivamente (Brzoska et al., 2005). En ratas diabéticas y en heridas tratadas con mitomicina el implante ASCs más una matriz dérmica acelera la cicatrización (Nanbu et al., 2007, 2009)

IV.3.4. Aplicaciones Clínicas

Dentro de los primeros casos de uso clínico se encuentra la utilización de ASCs para tratar grandes defectos de calota asociado a “pegamento de fibrina” y una matriz biodegradable (Lendeckel et al., 2004). Se ha utilizado también en la reconstrucción de mandíbula con 1 paciente sometida a hemimandibulectomía con posterior reconstrucción colgajo más matriz ósea más BMP-2 más ASCs autólogas con éxito en la formación de hueso a los 8 meses (Mesimäki et al., 2009).

Garcia-Olmo et al. (2009) ha publicado la utilización de ASCs para el cierre de fístulas enterocutáneas en pacientes con enfermedad de Crohn ya sea en forma directa como aplicadas luego de cultivo (expandidas), obteniendo de un 75% en este último tratamiento. También se las ha utilizado con éxito en 1 paciente para el cierre de una fístula traqueomediastínica producida por radioterapia (Alvarez et al., 2008).

La inyección de grasa autóloga lipoaspirada más ASCs para aumento de tejido blandos constituye un nuevo procedimiento denominado cell-assisted lipotransfer (CAL) descrito por Matsumoto et al. (2006) quien plantea que esto da un 35% más de supervivencia al injerto graso. Posteriormente Yoshimura et al. (2008) describe este procedimiento para mamoplastía de aumento sin prótesis en 40 pacientes.

Rigotii et al. (2007) ha descrito la inyección de lipoaspirado purificado en úlceras cutáneas de difícil cicatrización secundarias a radioterapia, con éxito en 20 pacientes.

Un hecho interesante que ha tenido aplicación clínica es el uso de ASCs en transplante de órganos cuando hay un rechazo agudo inmanejable con corticoides. Esto basado en la hipótesis que las ASCs disminuyen la respuesta inmune del huésped (Uccelli et al.). Fang & Song (2007) encontraron respuesta favorable en 5 de 6 casos con este cuadro.

Finalmente cabe mencionar que se están realizando estudios clínicos para evaluar la respuesta de ASCs en infarto agudo al miocardio e insuficiencia cardíaca, se piensa que podrían ser igual de efectivas que las BM-MSCs de las cuales se ha publicado una mejora en la función ventricular de un 6,1% con su uso en un metaanálisis que incluye 516 pacientes randomizados (Singh et al., 2009).

IV.4. Sustitutos cutáneos

Una alternativa de tratamiento de lesiones cutáneas profundas y extensas, en donde los sitios dadores de injerto escasean, es el uso de sustitutos cutáneos o “piel artificial”. En el último tiempo ha habido un progreso significativo, respecto a su producción y uso.

Los 3 requerimientos mayores de un sustituto cutáneo son: primero ser seguros para el paciente, segundo ser clínicamente efectivos y tercero ser prácticos para su uso. En general no deben ser tóxicos o inmunogénicos o causantes de inflamación excesiva y deben tener el mínimo posible de riesgo en transmisión de enfermedades. Los biomateriales para reconstrucción cutánea deben ser biodegradables y capaces de soportar la reconstrucción del tejido normal, con características mecánicas y físicas similares a la piel reemplazada. Deben aliviar el dolor, prevenir la pérdida de fluidos y calor desde la superficie de la herida, así como protegerla de la infección (Shevchenko et al., 2010).

Se clasifican según:

1) *Estructura anatómica*

- Dermoepidérmico (compuesto)
- Epidérmico
- Dérmico

2) *Duración*

- Permanente
- Semi-permanente
- Temporal

3) *Tipo de material*

- Biológico: autólogo, alogénico, xenogénico
- Sintético: Biodegradable o no.

4) *Composición celular.*

- Celular
- Acelular

5) *Ocurrencia de la primera colonización celular*

- *In vitro*
- *In vivo*

A continuación mencionaremos algunos de los sustitutos más frecuentemente utilizados y citados, ordenados respecto a su estructura anatómica:

IV.4.1. Compuestos

La revisión de la literatura realizada nos sugiere que no hay un sustituto cutáneo bilaminar “verdadero” y permanente para el tratamiento de lesiones cutáneas profundas.

Apligraf: Consiste en una matriz-gel de colágeno tipo I bovino, con fibroblastos alógenos neonatales en su interior y una superficie de queratinocitos alógenos neonatales confluentes, formando una estructura semejante en histología a la piel humana. Aunque el producto no causa reacción inmunológica, las células alógenas no sobreviven más de 2 meses en la matriz (Griffiths et al., 2004). En la práctica es un apósito biológico activo, que libera citoquinas y factores de crecimiento, tales como interferon α y β e Interleuquinas 1,6 y 8. No hay reportes de su uso en quemaduras y no puede ser utilizado como injerto definitivo para el cierre de la herida. La autorización de su uso es sólo para el tratamiento de úlceras venosas y pie diabético.

OrCell: Estructura y componentes similares a Apligraf. Se reabsorbe de manera similar. Este producto se encuentra autorizado desde el año 2001 para su uso en quemaduras y epidermolisis bulosa.

PolyActive: Producto bilaminar, conformado por queratinocitos y fibroblastos autólogos sembrados en una matriz PolyActive. Esta matriz consiste en un polímero sintético. Puede ser considerado como un apósito biológico activo o como un sustituto dérmico permanente. Es más costoso que los anteriores por el método de confección.

Hyalograft 3D combinado con Laserskin: Realizado en base a fibroblastos autólogos en una membrana microperforada de ácido hialurónico. Al utilizarlo con su par Laserskin se constituye in injerto compuesto. Estudios aleatorizados muestran éxito en el tratamiento de úlceras por decúbito y pie diabético. Este sistema puede permitir el cierre definitivo de la lesión (Uccioli et al., 2003).

IV.4.2. Sustitutos epidérmicos

Si bien se han realizado cultivos de queratinocitos y se ha demostrado utilidad clínica, el real beneficio es controversial a la fecha.

El primer paso para el desarrollo de un sustituto epidérmico es el aislamiento de queratinocitos y el cultivo de éstos. De un biopsia inicial den 2 a 5 cm² se obtienen los queratinocitos que son cultivados en un medio suplementado hasta obtener confluencia celular, luego se despega el tejido cultivado por medios enzimáticos. Esta técnica permite expandir la pequeña muestra entre 1,4 a 4,1 m². Al aplicarlos en vivo existen inconvenientes como la friabilidad del tejido y la poca maniobrabilidad, luego el rendimiento de la integración tisular varía ampliamente, principalmente por falta de expresión de integrinas responsables del anclaje a la lámina basal (Chester et al., 2004). Este pobre anclaje resulta en ampollas que al menor roce se rompen (Gallico III et al., 1984).

Una opción a este último inconveniente es utilizar queratinocitos subconfluentes, que se pueden obtener más fácilmente al 5 o 7 día de cultivo. Estas células presentarían un mayor grado de flexibilidad, propagación y adherencia, al

formar una membrana basal con mayor facilidad (Andree et al., 2001). La forma de propagación puede ser a través de aerosol, a través de sello de fibrina o mediante una membrana sintética.

Epicel, Epibase, Epidex: Son fabricados con queratinocitos del propio paciente, hasta confluencia celular a los 15 días de cultivo. Mientras Epicel y Epibase obtienen queratinocitos de una biopsia cutánea, Epidex los obtiene desde los folículos pilosos. A pesar de los inconvenientes que presenta la utilización de estos cultivos y la corta sobrevida, no mayor a 24 horas, aún se mantienen como una alternativa para pacientes quemados extensos (Atiyeh & Costagliola., 2007)

MySkin: Este producto utiliza queratinocitos autólogos subconfluentes en una lámina de silicona especialmente diseñada que ofrece mayor maniobrabilidad y menor tiempo de cultivo. Este producto es indicado para el tratamiento de úlceras por decúbito, pie diabético, quemaduras intermedias y tratamiento de zonas dadoras de injerto. No debe ser utilizado como tratamiento único en lesiones de espesor total.

Laserskin: Consiste en queratinocitos autólogos cultivados en una membrana microperforada de ácido hialurónico. Estudios preliminares muestran un potencial prometedor.

Bioseed-S: Contiene queratinocitos subconfluentes resuspendidos en un sello de fibrina. A la fecha ha sido utilizado para el tratamiento de úlceras venosas crónicas de extremidad inferior resistentes a la terapia habitual (Johnsen et al., 2005).

CellSpray: Consiste en la aplicación mediante spray de queratinocitos subconfluentes. Esto permite la proliferación y diferenciación en vivo. La utilización actual es sólo para lesiones de espesor parcial y zonas dadoras de injerto dermoepidérmico.

IV.4.3. Sustitutos dérmicos

Los sustitutos dérmicos se hacen necesarios previo a un injerto dermoepidérmico para obtener mayor prendimiento de éste, mejor calidad de la piel final y cobertura durante el período agudo de una lesión profunda.

AlloDerm, Karoderm, SureDerm, GraftJacket: Consisten en dermis acelular humana procedente de cadáver. Al ser injertados la integración es rápida, no generan rechazo, ni causan respuesta inmungénica debido a la eliminación del componente celular. Se los ha utilizado en el tratamiento de lesiones cutáneas profundas, quemaduras y en resección de cicatrices hipertróficas con éxito. Últimamente se ha ampliado su uso para el relleno de partes blandas.

Permacol, Matriderm: También son obtenidos a partir de dermis acelular, como AlloDerm, pero de origen animal. Permacol es de origen porcino y Matriderm de origen Bovino.

OASIS: Es producido a partir de submucosa de intestino delgado porcino. No existen muchas referencias respecto a su uso clínico aún.

Integra, Terudermis, Pelnac: Son matrices artificiales de colágeno animal cubiertos por una lámina de silicona de protección. Su utilización requiere de un segundo tiempo quirúrgico para injertar la parte epitelial. En el caso de Integra la matriz está compuesta de Colágeno tipo I de bovino y cartílago de tiburón. Terudermis es una matriz de sólo colágeno bovino. Pelnac es una matriz de colágeno porcino.

Biobrane, TransCyte: Es un sustituto dérmico transitorio semipermeable de silicona y nylon con colágeno porcino incorporado. TransCyte añade fibroblastos neonatales alógenos. Su uso está indicado para el tratamiento de lesiones cutáneas de profundidad intermedia y tratamiento de zonas dadoras de injerto. Deben ser removidos entre los 7 a 14 días de uso.

Dermagraft: Es una malla de poliglactina sembrada con fibroblastos neonatales alógenos. El material se degrada a los 30 días de uso. Este material está autorizado para ser aplicado en úlceras crónicas venosas y pie diabético.

Hyalomatrix PA, Hyalograft 3D: Estos productos están desarrollados en base a una malla de ácido hialurónico. El ácido hialurónico es obtenido principalmente de crestas de gallo o de producción recombinante en Streptococo. Hyalograft 3D se encuentra potenciado con un cultivo de fibroblastos autólogos. Ambos productos requieren de la adición de un injerto dermoepidérmico posterior. En el caso Hyalograft 3D se ha realizado un injerto compuesto al utilizarlo con Laserskin en forma simultánea.

V. Hipótesis de trabajo

La hipótesis planteada es que la asociación de Integra® con ASCs acelera la cicatrización, aumentando la densidad microvascular y la síntesis de colágeno en injertos de piel en rata, generando un cicatriz de mejor calidad.

VI. Objetivos

VI.1. Objetivos Generales del Estudio:

Aportar nuevos conocimientos en el campo de la medicina regenerativa

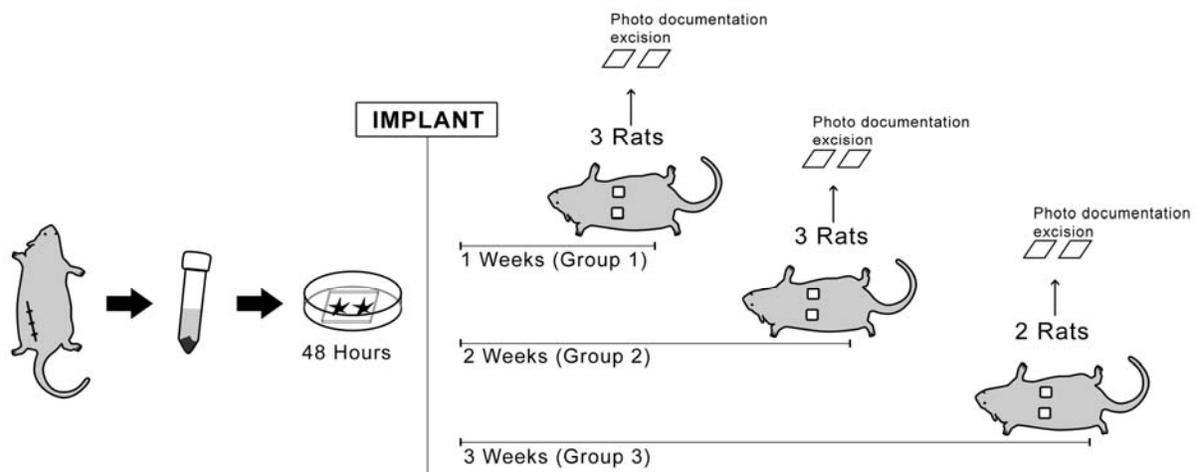
VI.2. Objetivos Específicos:

- 1) Desarrollar la técnica de obtención de ASCs en ratas.
- 2) Evaluar la adherencia de las ASCs a la matriz dérmica *in vitro*
- 3) Evaluar el comportamiento histológico de la cicatrización *in vivo* en este modelo experimental.
- 4) Establecer marcadores inmunohistoquímicos vasculares y epiteliales para comparar la densidad microvascular y la formación de epitelio.
- 5) Cuantificar la formación de colágeno

VII. Material y método

VII.1. Diseño del estudio

Se diseña un estudio prospectivo con un total de 8 ratas. A cada rata se le seccionan 2 segmentos cutáneos contra laterales y se reemplazan con Integra más ASCs autólogas en un lado y sin ASCs al otro lado. Transcurrida la primera semana se sacrifican 3 ratas para estudio histológico, luego en la segunda semana otras 3 y en la tercera semana las 2 restantes (Figura 16)



Schematic Overview of Experiments

Figura 16. Representación esquemática del diseño del estudio

VII.2. Animales y Anestesia

Se utilizaron 8 ratas macho Sprague Dawley con un peso promedio de 280g. Todo el procedimiento es realizado según las normas bioéticas del ICBM para la experimentación con animales de laboratorio (protocolo CBA #408 FMUCH, Septiembre 2010). La antisepsia cutánea se realiza con solución de clorhexidina al 2%. Se administra preoperatoriamente penicilina benzatina 40.000 U/Kg IM. La anestesia se administra en forma intraperitoneal y consiste en una solución

compuesta de Ketamina 80mg/kg y Xilacina 8 mg/kg, esto permite un tiempo de anestesia profunda entre 30 a 45 minutos.

VII.3. Obtención del tejido adiposo

Se realiza una incisión en la región inguinal derecha disecando el panículo adiposo subcutáneo, obteniendo una pieza con un peso promedio de 1,42grs, la cual se corta en múltiples fragmentos. Se realiza hemostasia y se sutura la incisión (figura 17).

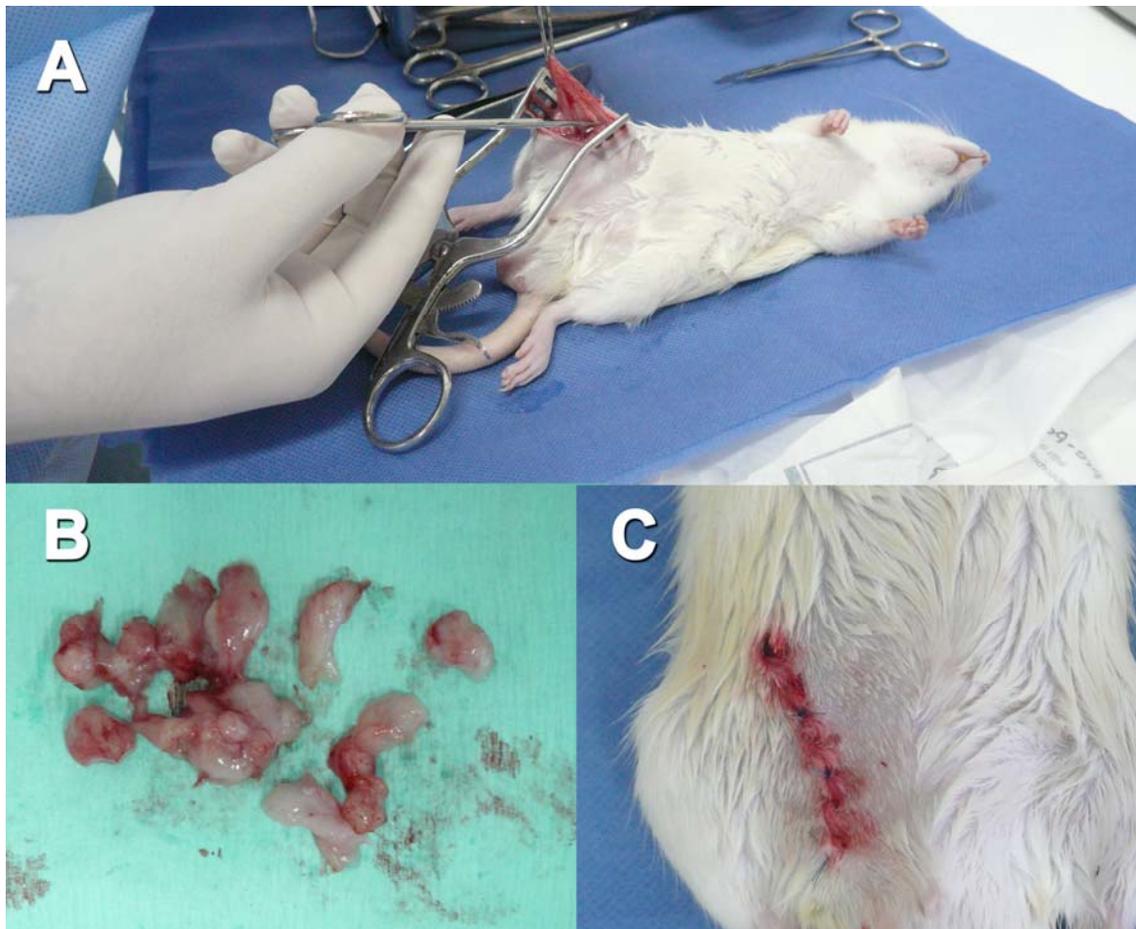


Figura 17. Obtención del tejido adiposo. (A) disección inguinal, (B) fragmentación de la muestra (c) sutura de la herida.

VII.4. Obtención de las células troncales

El tejido adiposo fraccionado es lavado con solución buffer-fosfato 1x, digerido con colagenasa II al 0,15% por 60 minutos a 37°C, luego es neutralizado con volumen equivalente de medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle's Medium + 10% Suero bovino fetal + 1% Antibióticos y antimicóticos) para ser centrifugado por 10 minutos a 1200g. Se obtiene un pellet el cual es resuspendido en medio de cultivo (figura 18). En esta solución la concentración media de células troncales es de 1.95×10^5 células/ml, con una viabilidad celular superior al 95% (evaluado con tinción azul tripán).

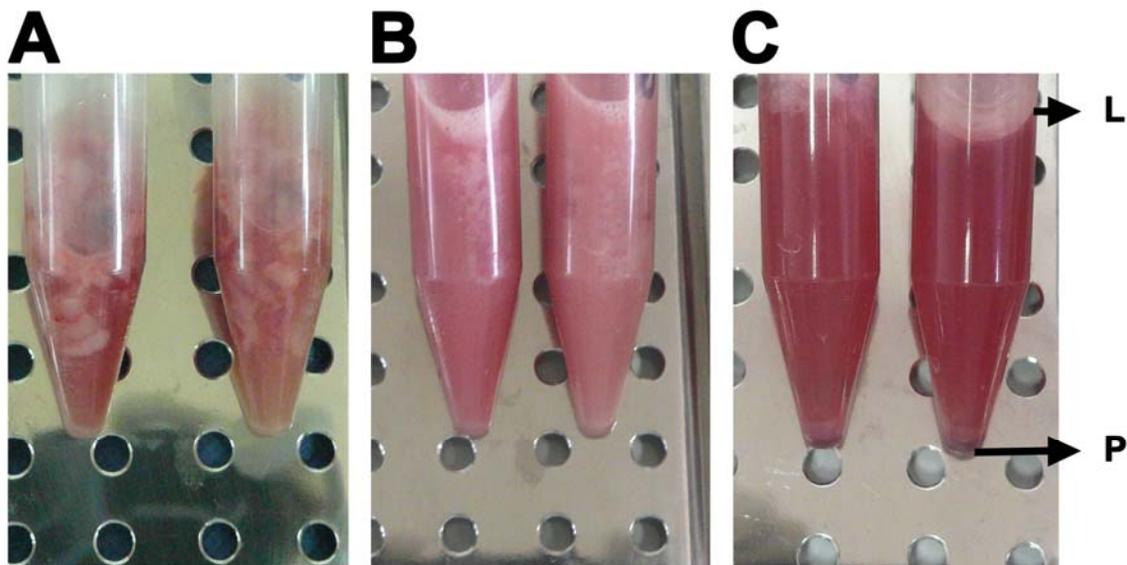


Figura 18. Técnica para la obtención de células troncales derivadas del tejido adiposo en ratas. (A) lavado con PBS (B) digestión con colagenasa (C) centrifugación. (L) Fracción lipídica del centrifugado, (P) Pellet del centrifugado

VII.5. Cultivo Celular

La solución obtenida del pellet se sembró en una placa de 40mm en conjunto con un segmento de Integra de 2.5x2.5 cm, el cual ha sido dispuesto de modo que la lámina de silicona queda hacia abajo. Del mismo modo se dejan en medio de cultivo

los segmentos de Integra que serán utilizados como control. Las placas son mantenidas en incubadora por 48 hrs a 37°C y 5% CO₂ (figura 19).



Figura 19. Cultivo de las ASCs en Integra. (A) los segmentos de Integra de 2.5 x 2.5 cm son posicionados en las placas de cultivo de 40 mm, en donde se agrega el medio con y sin células. (B) aspecto del cultivo a las 48 horas, en I y II se observa el viraje del rojo fenol, indicando actividad metabólica.

VII.6. Estudio inmunohistoquímico de doble marcaje.

Con el fin de evaluar el crecimiento y morfología celular durante el cultivo, se colocó un cubre objeto estéril en el fondo de una de las placas de cultivo ASCs iniciando el segundo pasaje, para que las células se adhieran a él y facilitar la técnica a desarrollar. Al 3° días se extrajo el cubre objeto y se sumergió, durante 6 minutos, en una placa petri conteniendo metanol a – 20°C y posteriormente 1 minuto en acetona, a la misma temperatura, para luego pasarlo por tampón fosfato durante 5 minutos y cubrirlo con suero de cabra 1/10 en PBS-BSA al 2% dejándolo en una cámara húmeda por 1 hora. En el doble marcaje se utilizó, como anticuerpo primario,

antivimentina (Dako) 1/100, para destacar los filamentos intermedios de las ASCs, dejándolo toda una noche en refrigeración. Luego, como anticuerpo secundario se utilizó IgG FITC (Vector) en dilución 1/200 y además se empleó la técnica de Propidio (Polysciences) 1/500 para evidenciar la cromatina de los núcleos en color rojo. Montaje en medio acuoso (DAKO® Faramount, S3025). Visualización en microscopio de fluorescencia UV con filtro mixto.

VII.7. Estudio inmunohistoquímico para fosfatasa alcalina NCIP/NBT

Esta tinción permitió identificar el carácter indiferenciado de las ASCs. Se colocó un cubre objeto estéril en el fondo de una de las placas de cultivo ASCs iniciando el segundo pasaje, para que las células se adhirieran a él y facilitar la técnica a desarrollar. Al 3° días se extrajo el cubre objeto y se sumergió, durante 6 minutos, en una placa petri conteniendo metanol a – 20°C y posteriormente 1 minuto en acetona, a la misma temperatura, para luego pasarlo por tampón fosfato durante 5 minutos. Se agregan 4 gotas de la solución preparada DAKO® BCIP/NBT (DAKO, K0598) y se deja incubando a 4°C por 60 minutos en oscuridad. Montaje en medio acuoso (DAKO® Faramount, S3025). Visualización en microscopía óptica convencional.

VII.8. Microscopía electrónica de barrido

Este procedimiento se utilizó para evaluar la adherencia de las ASCs a la matriz dérmica artificial. Los trozos de integra® con ASCs en cultivo luego de 48 horas son fijados con glutaraldehído al 2%, secado con CO₂ a punto crítico y metalizado con oro/paladio. Visualización en Unidad de Microscopía Electrónica- CESAT-ICBM- Facultad de Medicina.

VII.9. Implante del sustituto dérmico

Se marcó con plumón dos áreas contralaterales de 2,5 x 2,5 cm en una región intermedia del dorso de las ratas (figura 20A). Se realizaron incisiones de espesor total en la piel, de modo de remover un segmento cutáneo que incluya epidermis, dermis y parte del tejido graso subcutáneo (figura 20B). Se injertó el Integra procedente de la cámara de cultivo, suturando a la piel adyacente con puntos separados de Nylon 4/0 (figura 20C). Una vez realizado el procedimiento se mantuvo el animal en observación por 45 minutos con el calor radiante de una lámpara. Se verifica respiración adecuada y luego recuperación total de la anestesia.

A la semana se retira el film de silicona (figura 26a), dejando la matriz neovascularizada al aire libre para favorecer la formación de epitelio.

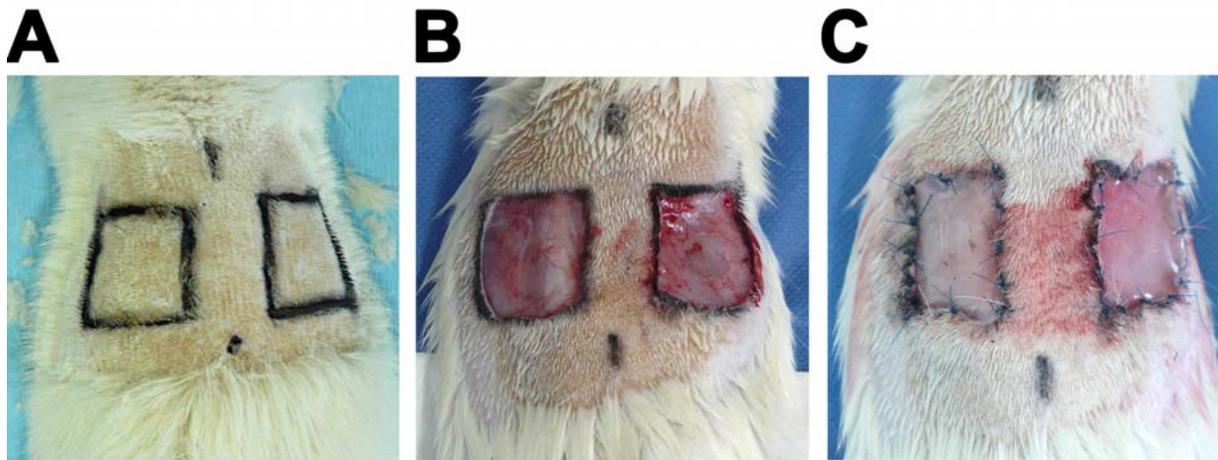


Figura 20. Secuencia del proceso de injerto de Integra. (A) marcateo con plumón del área a resear. (B) sección de la piel en espesor total. (C) sutura con puntos separados.

VII.10. Evaluación macroscópica

Las ratas se sacrificaron a los 7, 14 y 21 días, con una sobredosis de tiopental sódico (180 mg/kg) intraperitoneal. Se evalúa a simple vista el aspecto del injerto, se

documenta con fotografía y se mide en su diámetro mayor, luego se secciona y retira la piel completa del dorso incluyendo el sitio injertado.

VII.11. Evaluación microscópica

Los segmentos cutáneos que contienen el injerto son fijados con formalina tamponada al 10% por 48hrs, luego se realiza la inclusión en parafina para poder realizar cortes histológicos de 5 μm de grosor. Las tinciones realizadas correspondieron a Hematoxilina-Eosina para evaluar estructura celular, tricrómica de Mallory para identificar morfología de fibras colágenas e invasión celular, histoquímica rojo sirio de Junqueira para evaluar disposición y cantidad del colágeno tipo 1 (Junqueira et al., 1979). Las tinciones inmunohistoquímicas realizadas fueron anti-factorVIII para identificar endotelio y cuantificar vasos (marcador panendotelial) y anti-citoqueratina 34 β E12 para cuantificar la formación epitelial (marcador para citoqueratinas de alto peso molecular).

Las fotografías de los preparados histológicos fueron evaluadas con un microscopio Carl Zeiss conectado a una cámara digital Canon de manejo remoto, las mediciones lineales fueron realizadas con el programa de imágenes "AxioVision 4.8" y la cuantificación de colores es realizada con el programa de imágenes "Image Pro Plus 6.0".

Las imágenes, que son analizadas con alguno de los programas de imágenes, fueron tomadas a 50x con un mismo estándar de luz y fotografía.

VII.11.1. Avance de epitelio

El anticuerpo anticitoqueratina 34 β E12 (Dako-Cytokeratin 34 β E12, USA) permite identificar con claridad la presencia de epitelio cutáneo queratinizado.

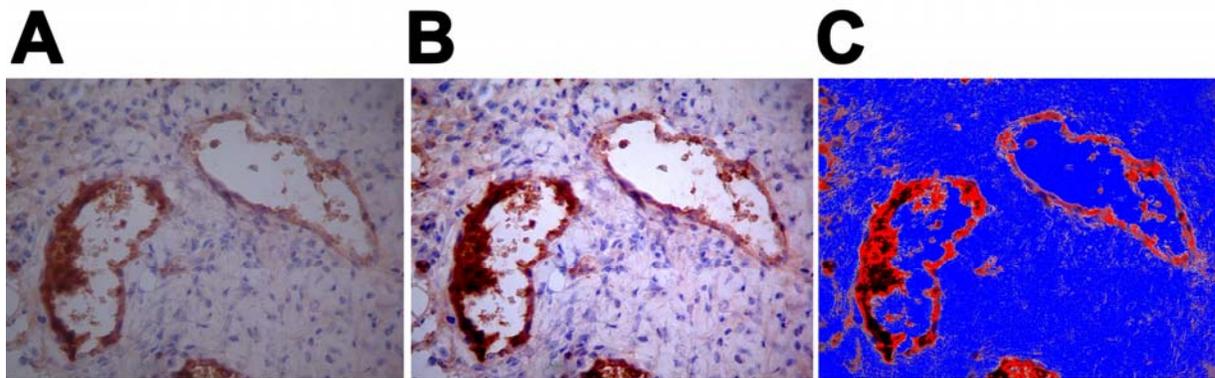
Mediante imágenes microscópicas tomadas a 50x en un segmento representativo de la lesión, se cuantifica el avance del epitelio linealmente (figura 21) y se suman los bordes derecho e izquierdo. Obteniendo una medición expresada en μm para cada sitio tratado.



Figura 21. Cuantificación lineal del epitelio en un lado de una lesión. Tinción Inmunohistoquímica para citoqueratina 34 β E12. Aumento 50x

VII.11.2. Densidad microvascular

El anticuerpo anti-factor VIII (Dako® Rabbit anti-mouse Von Willebrand Factor) se utilizó para identificar células endoteliales y de este modo cuantificar la presencia de neovasos. Se cuantificó la positividad en 3 áreas distintas de cada corte histológico, obteniendo un total de 48 mediciones. En la figura 22 se ejemplifica como el software identificó el cromógeno positivo (color café) y lo expresa en porcentaje respecto del fondo.

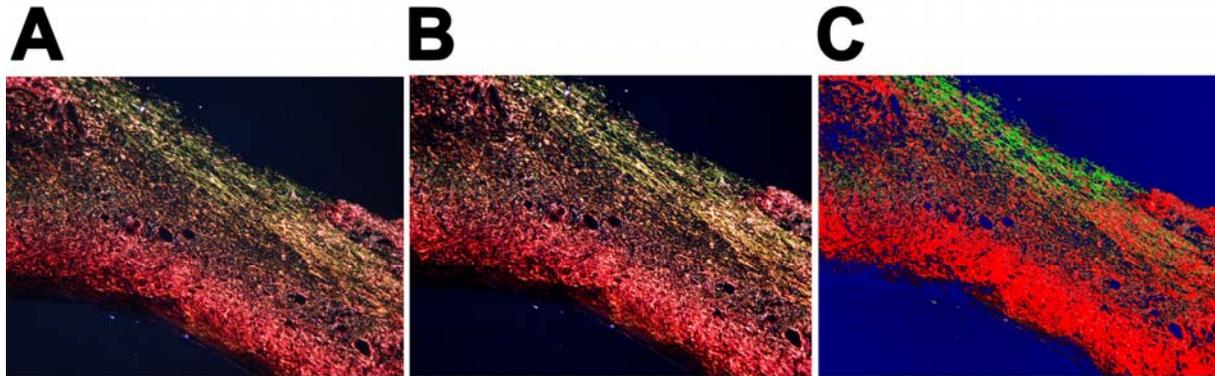


Range	Objects	% Objects	% Area
1	19173	21.568384	8.4862747
2	42091	47.349651	2.9789870
3	27630	31.081963	88.534737

Figura 22. Imágenes representativas del proceso para cuantificar el cromógeno asociado al anticuerpo anti-factor VIII. (A) Fotografía inicial, (B) Contraste automático sugerido (C) descomposición de los colores. Finalmente se expresa en una tabla el % de color positivo.

VII.11.3. Cuantificación de colágeno

En los cortes histológicos procesados con la tinción rojo sirio de Junqueira se tomaron 3 fotografías por muestra en el microscopio óptica a 50X y con luz polarizada. Con esta luz se identificó de color rojo-amarillo las fibras de colágeno tipo I (colágeno maduro) y verdes las fibras de colágeno tipo III. La imagen obtenida fue procesada para descomponer los colores y cuantificar en porcentajes la cantidad de ambos, respecto del total de la fotografía (figura 23).



Range	Objects	% Objects	% Area
	33414	37.852165	34.802544
	24280	27.504955	3.1610653
	30581	34.642876	62.036392

Figura 23. Cuantificación del colágeno. (A) la imagen directa del microscopio con luz polarizada 50x. (B) Contraste automático (C) descomposición de colores. En la tabla se cuantifica la cantidad de colágeno tipo I (rojo) y tipo III (verde).

VII.12. Estadística

Los resultados se expresan en promedios. Se utilizó la prueba de t-student para muestras pareadas con el objeto de determinar diferencias estadísticas significativas. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

VIII. Resultados

VIII.1. Cultivo celular

La imagen obtenida por inmunofluorescencia de doble marcaje al 3° de cultivo nos permite ver células subconfluentes con un aspecto fibroblástico, presencia pseudopodios y filopodios cortos (Figura 24). Todas las células resultaron ser positivas para el anticuerpo antivimentina, demostrando su origen mesenquimático.

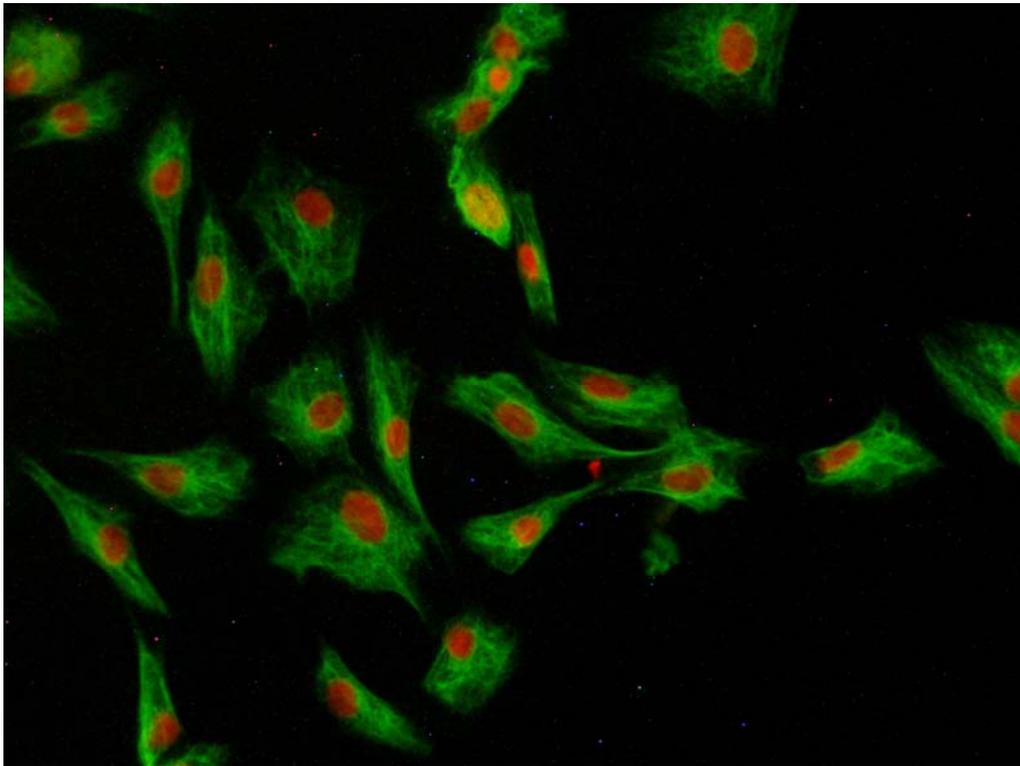


Figura 24. Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo (ASCs) de rata, marcadas mediante inmunotinción doble: Los núcleos se observan con propidio y los filamentos intermedios con anticuerpo antivimentina-FITC. Aumento 200x.

VIII.2. Adherencia del ASCs a la Matriz dérmica artificial

Las 4 técnicas utilizadas para visualizar adherencia resultaron positivas (Figura 25), destaca como las células toman la forma de la estructura de la matriz, extendiendo sus filopodios en la estructura tridimensional (Figura 25 A y B). En la Figura 25B las células se ven redondas producto de la contracción que sufrieron con la fijación.

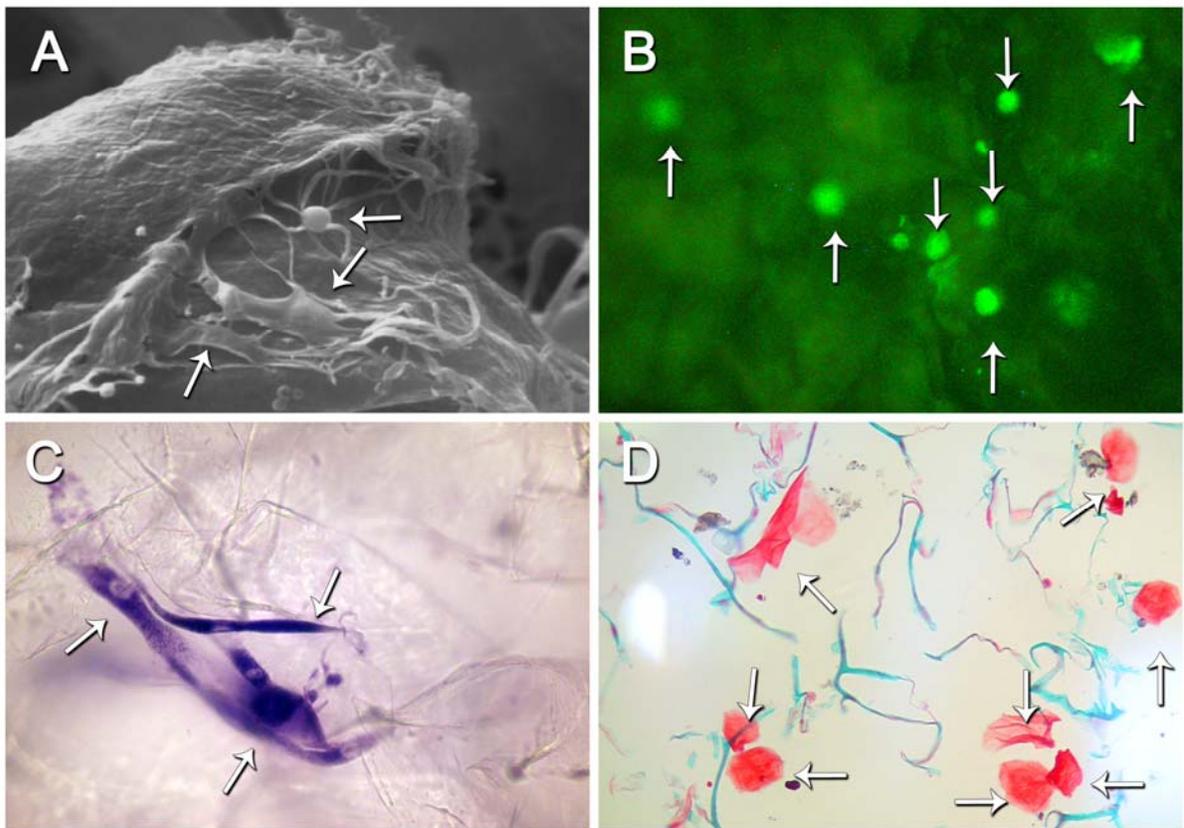


Figura 25. Adherencia de las ASCs (flechas) a la matriz dérmica Integra® a la 48 hrs de cultivo. (A) Vista en microscopia electrónica de barrido. (B) Visualización mediante inmunotinción anti-vimentina FITC. (C) Identificación mediante tinción con fosfatasa alcalina BCIP/NBT. (D) Corte histológico y tinción tricrómica de Masson.

VIII.3. Aspecto macroscópico de las lesiones

En la figura 26 vemos el aspecto de las lesiones luego de retirar el film de silicona. No se observaron signos de infección, ni de inflamación excesiva.

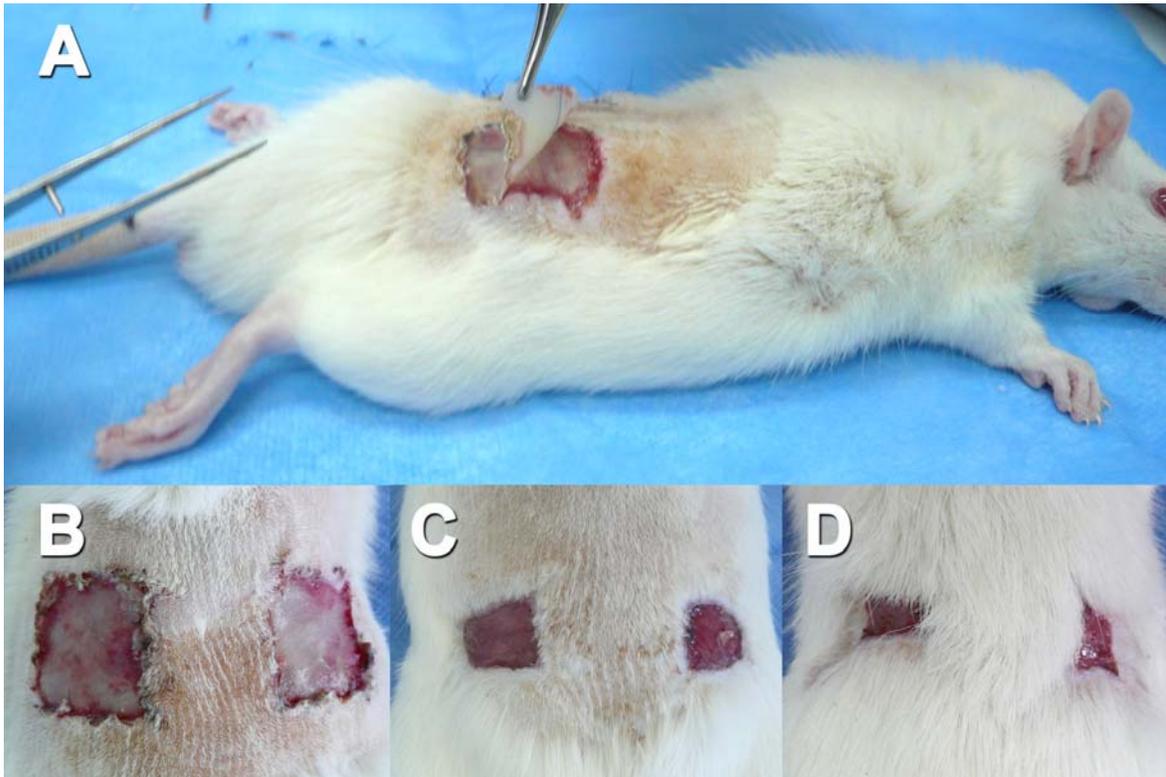


Figura 26. Aspecto macroscópico de las lesiones posterior al retiro del film de silicona (A). 7 días (B), 14 días (C), 21 días (D). Las áreas color “nácar” se deben a la presencia de fibrina y el color rojo a la presencia de neovasos.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el sitio intervenido con ASCs y el control al medir macroscópicamente el diámetro mayor de las lesiones en los 3 grupos, $p=0.4$ (figura 27)

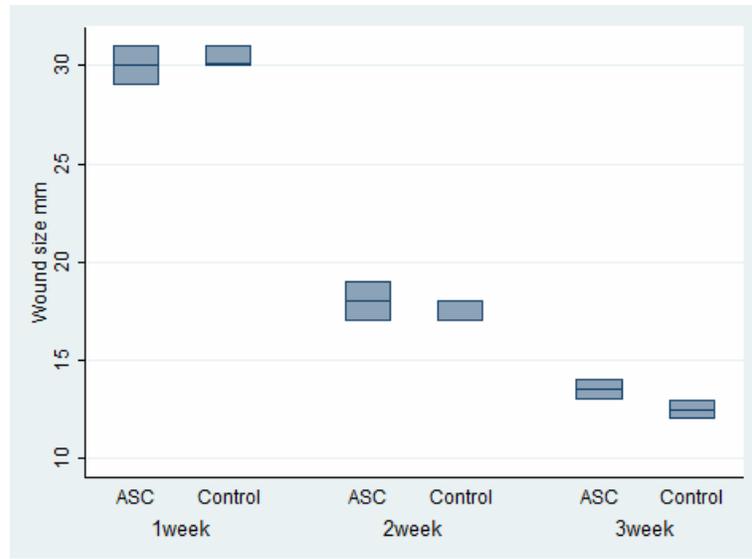


Figura 27. Tamaño de las lesiones en mm, comparando el sitio intervenido con ASCs v/s el lado control. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el tamaño, $p=0.4$.

VIII.4. Evaluación histológica de la matriz injertada en el tiempo

Mediante la tinción tricrómica de Masson se visualizó como la matriz de colágeno en los primeros 7 días es embebida por glóbulos rojos, luego invadida por células inflamatorias y fibroblastos, depositándose el colágeno nativo del huésped y comenzando a formar los primeros vasos sanguíneos. Durante la segunda semana se reemplaza paulatinamente el colágeno artificial por el nativo en forma organizada, se visualizan vasos sanguíneos más estructurados y aún presencia de abundantes células inflamatorias. Finalmente en la 3° semana queda poco colágeno artificial, el nativo es más denso y los vasos sanguíneos tienen un aspecto más dilatado (Figura 28). En algunas muestras se identificó presencia de células gigantes e infiltrado eosinofílico moderado, interpretándose como reacción a cuerpo extraño mínima.

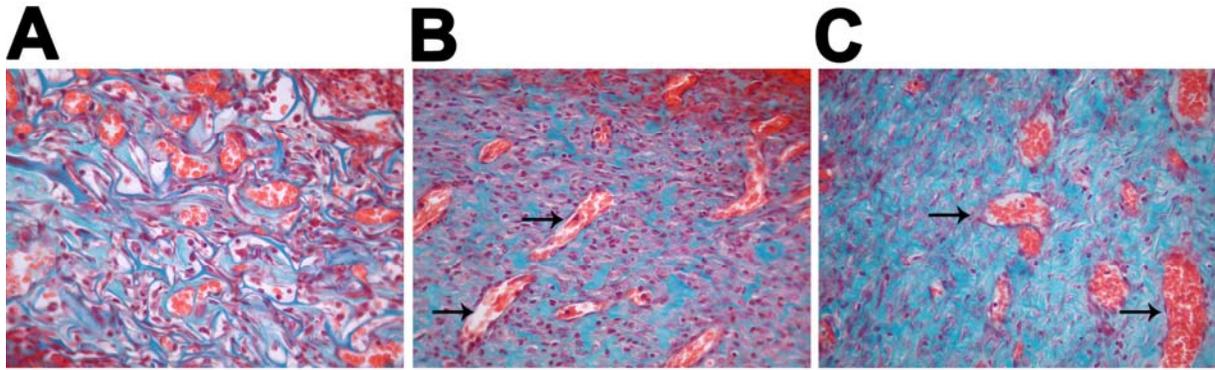


Figura 28. Corte histológico del injerto a los 7 días (A), a los 14 días (B) y a los 21 días (C). Tinción tricrómica de Masson. Aumento 400x. Las flechas indican los neovasos.

VIII.5. Avance de epitelio

Se evaluó la presencia de células positivas a la tinción anti-citoqueratina, no se identificaron células en la superficie del implante distintas a las que avanzaron desde el borde de la herida. Por lo tanto el epitelio medido es el que avanza desde los bordes de la lesión, considerando el punto de inicio en la medición la zona de transición entre la dermis nativa y la neodermis asociada al implante.

En las muestras obtenidas del primer grupo de ratas sacrificadas a los 7 días no encontró avance epitelial en ninguno de los bordes debido a que en este período, los implantes se encontraban cubiertos por la silicona que impide el avance epitelial (Figuras 29 A-D). A los 14 días el valor promedio de avance epitelial para el lado intervenido con ASCs fue de 1989 μm v/s 1645 μm en el control ($p=0.15$, NS) (Figuras 29 E-H). Por último a los 21 días el valor promedio de avance epitelial para el lado intervenido con ASCs fue de 3341 μm v/s 2311 μm en el control ($p=0.2$, NS) (Figura 29 I-L). El gráfico de los resultados se expresa en la figura 30.

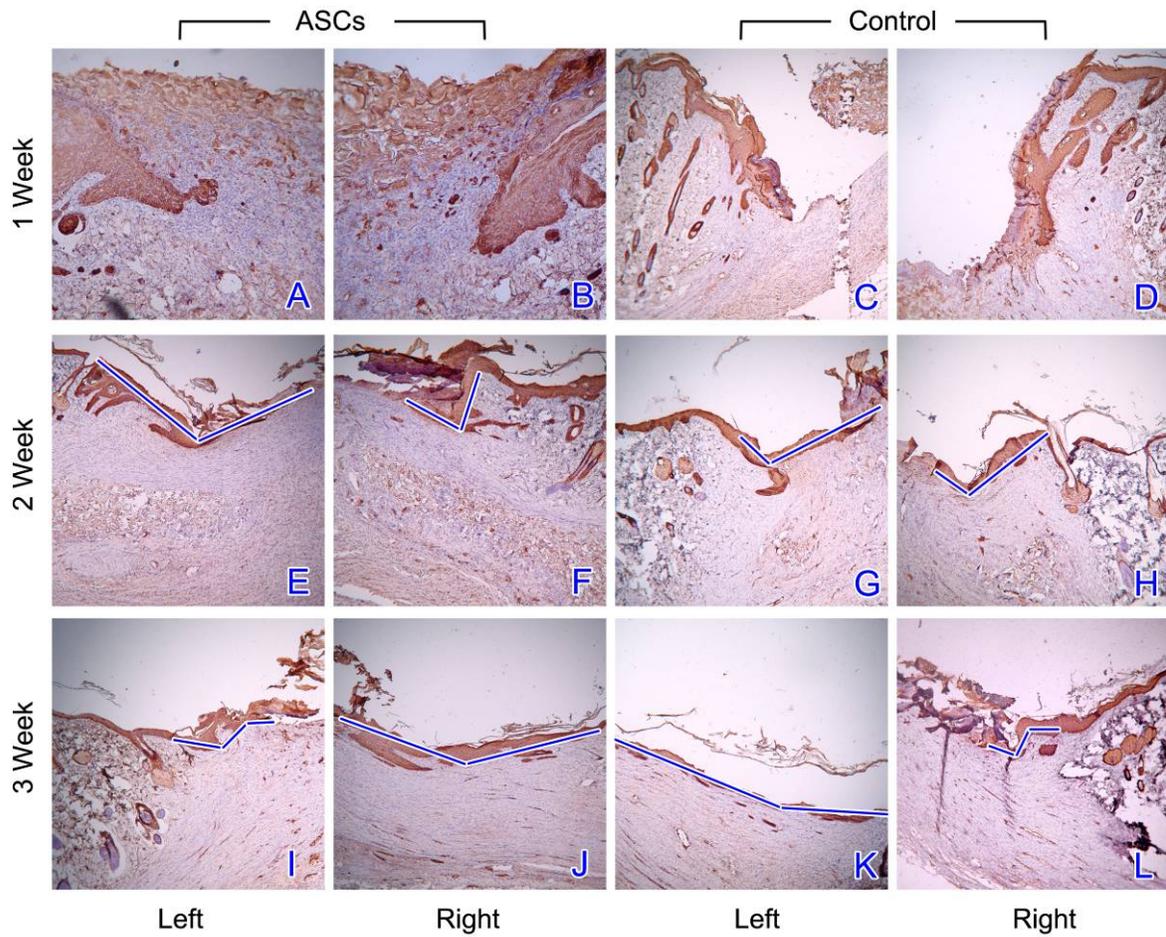


Figura 29. Visualización del avance epitelial sobre el implante en los 3 grupos de ratas, comparando el lado intervenido con ASCs y el control. La medida obtenida del lado derecho y el izquierdo se suman para obtener la cuantificación epitelial total sobre cada implante. En la primera semana se observa que no existe avance epitelial. Tinción anti-citoqueratina 34 β E12. Aumento 50x.

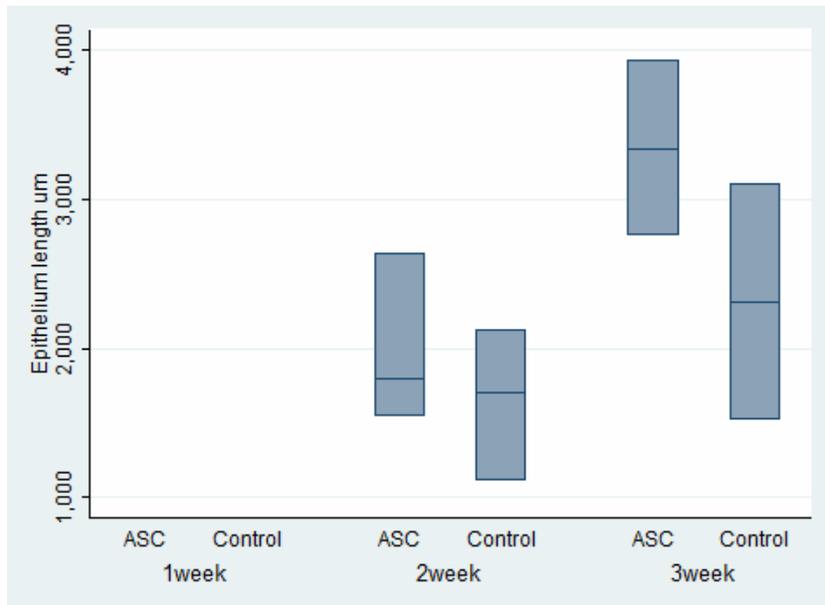


Figura 30. Comparación entre los promedios de epitelio del grupo intervenido con ASCs v/s el control. En la primera semana no hay avance de epitelio porque existe un film de silicona que impide su avance. En los siguientes dos grupos las diferencias no son significativas, $p=0.15$ en la segunda semana (NS) y $p=0.2$ en la tercera semana (NS)

VIII.6 Densidad microvascular

Todas las muestras arrojaron positividad con este marcador. Se cuantificó la positividad en 3 áreas de 5.67 mm^2 , distintas de cada implante, abarcando una importante superficie del corte para ser evaluado. La figura 31 muestra sólo 1 de las áreas evaluadas de cada implante (de un total de 3). Al realizar la cuantificación de color, las mediciones resultaron ser significativamente mayores en el sitio con ASCs v/s el control en los 3 grupos (Figura 32). El % de FVIII positivo en el implante con ASCs fue de 9.7 v/s 7.5 el control en el grupo 1 ($p=0,042$), 5.9 v/s 4.6 en el grupo 2 ($p=0,041$) y 7.3 v/s 2.8 en el grupo 3 ($p=0,0075$).

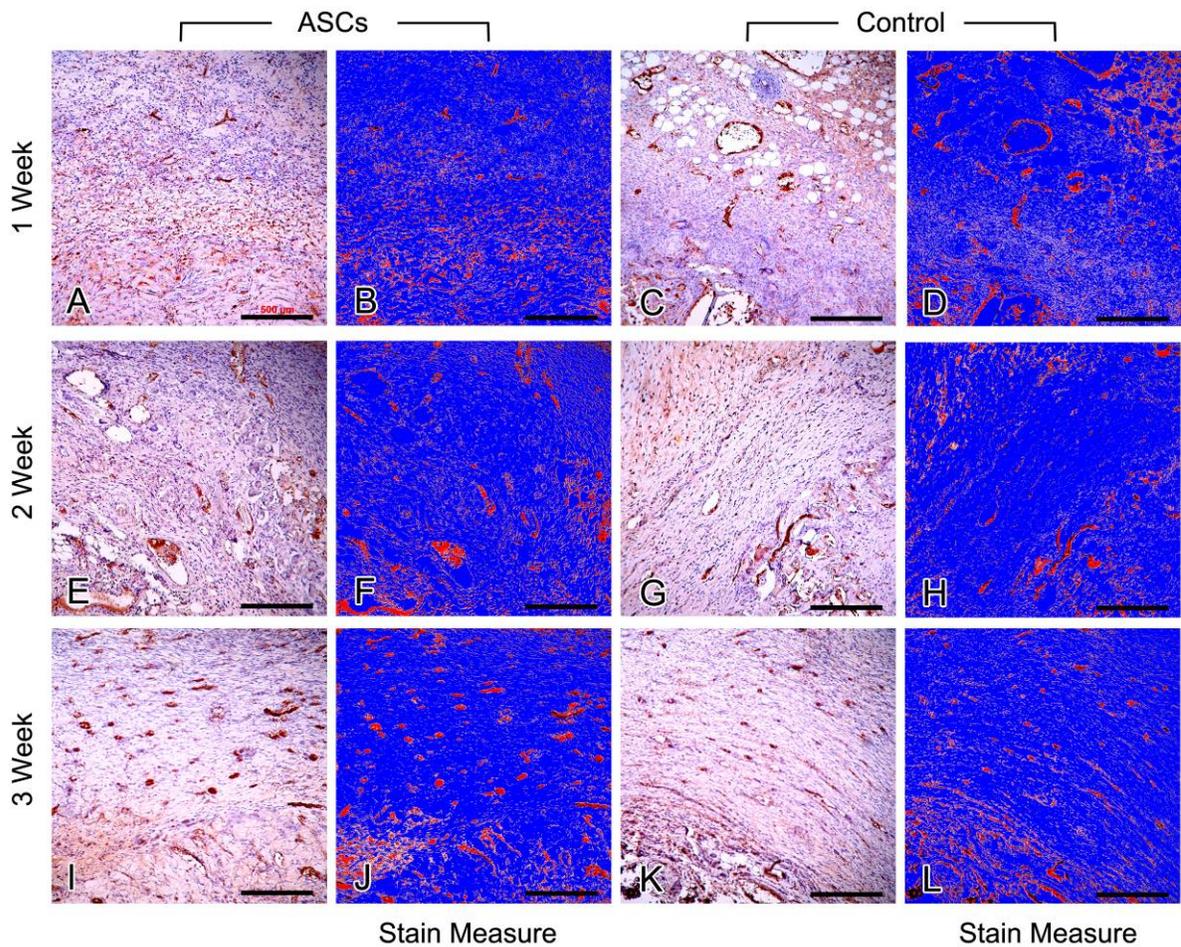


Figura 31. Visualización representativa de los cortes histológicos e inmunotición anti factor-VIII de 1 de las áreas de 1 rata de cada grupo intervenido. Las imágenes con fondo azul representan la substracción de colores realizada por el software Image Pro Plus 6.0. La regla mide 500 μ m.

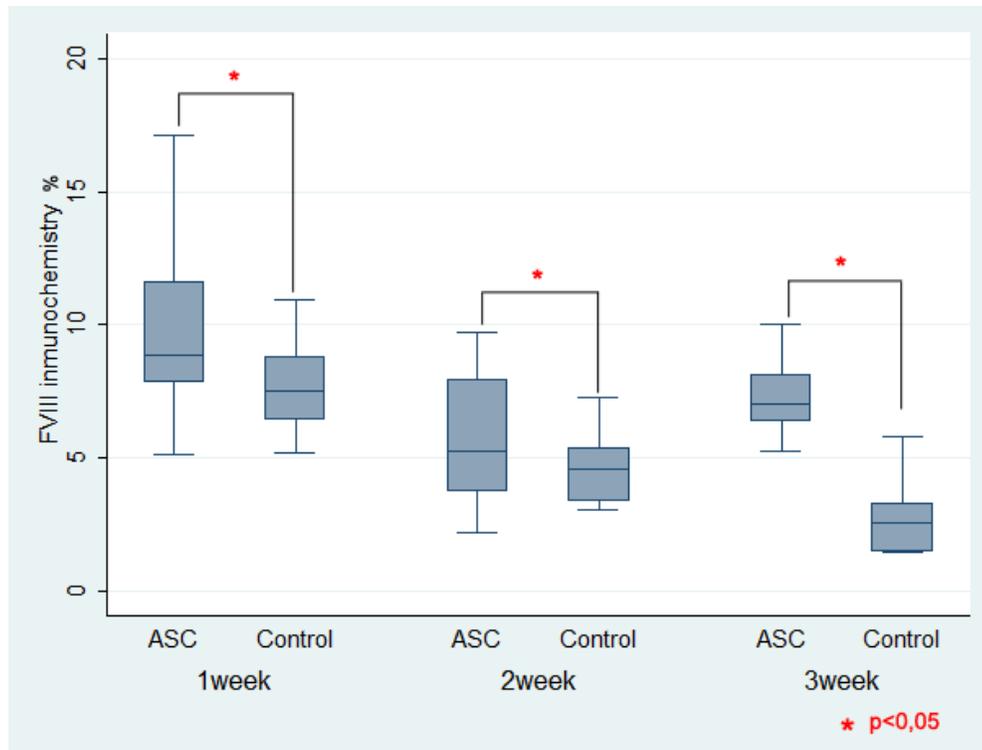


Figura 32. Comparación entre los porcentajes promedio de FVIII del grupo intervenido con ASCs v/s el control. Todos los grupos presentan diferencias significativas a favor del lado con ASCs, $p=0,429$ en la primera semana, $p=0,0412$ en la segunda semana y $p=0,0075$ en la tercera semana.

VIII.7 Cuantificación de colágeno

Se cuantificó los resultados de la descomposición de colores en rojo-amarillo (colágeno I) y verde (colágeno tipo III) en 3 áreas de 5.67 mm^2 , distintas de cada implante, abarcando una importante superficie del corte para ser evaluado. La figura 33 muestra sólo 1 de las áreas evaluadas de cada implante (de un total de 3).

Hay que recordar que el valor otorgado corresponde al porcentaje de color positivo respecto al total de la imagen incluyendo el fondo y no de la muestra únicamente.

Los resultados nos indican un aumento de la síntesis de colágeno tipo I en el sitio intervenido con ASCs, así como un predominio del colágeno tipo III en el sitio

control. La figura 34 ilustra como se distribuye la proporción de colágeno el los 3 grupos.

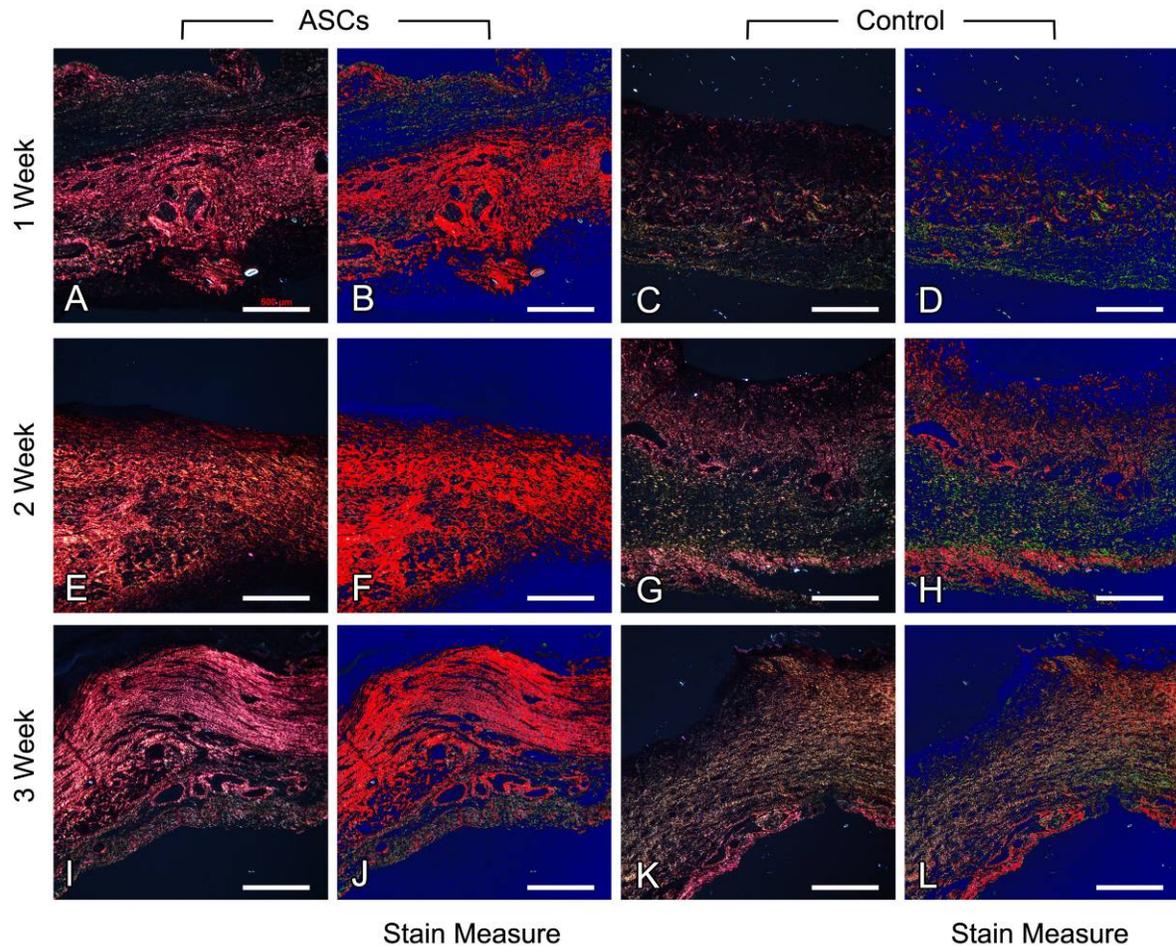


Figura 33. Visualización representativa de los cortes histológicos con tinción rojo Sirio de Junqueira de 1 de las áreas de 1 rata de cada grupo intervenido. Las imágenes B,D,F,H,J y L representan la substracción de colores realizada por el software Image Pro Plus 6.0. La regla mide 500 μ m.

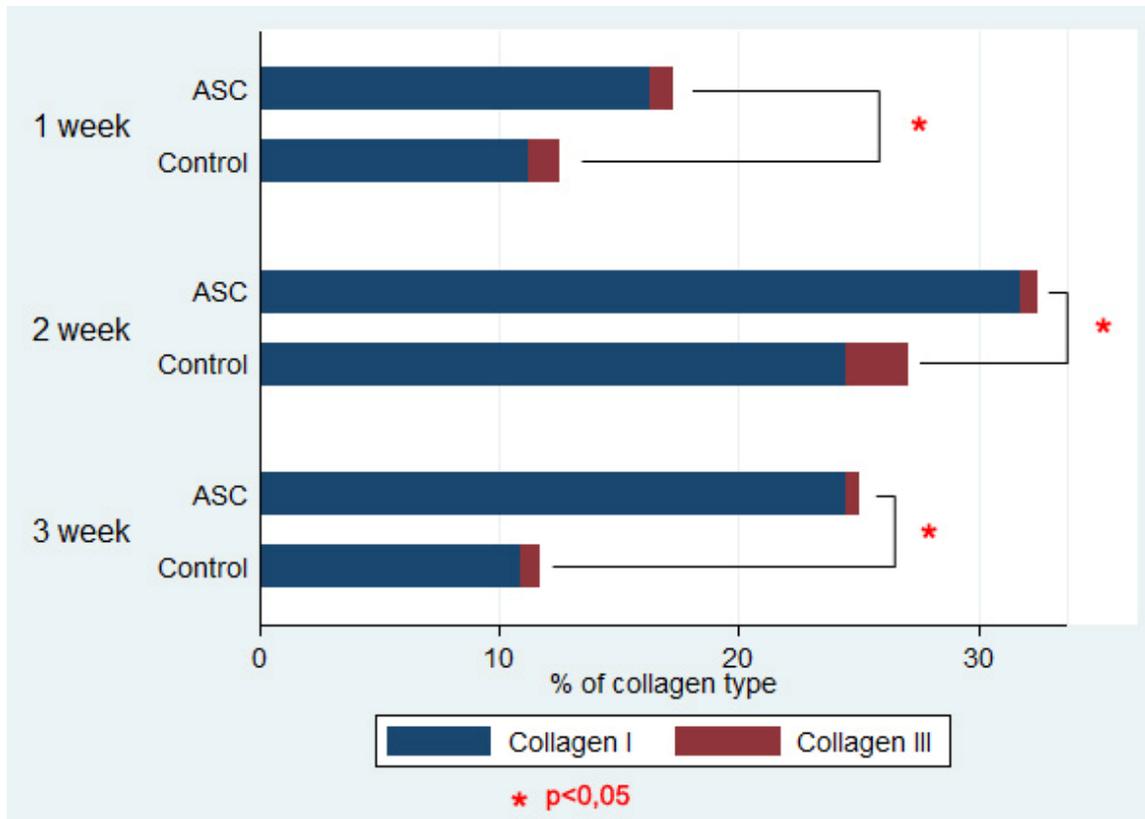


Figura 34. Comparación entre los porcentajes promedio de colágeno tipo I y tipo III en los sitios con ASCs v/s sus respectivos controles, en los 3 grupos de de ratas. Todos los grupos presentan diferencias estadísticamente significativas a favor de la producción de colágeno I en el implante con ASCs, $p=0.0001$ en el grupo 1, $p=0,02$ en el grupo 2 y $p=0.034$ en el grupo 3.

IX. Discusión

El presente estudio tuvo como objeto aportar nuevos conocimientos en campo de la medicina regenerativa, evaluando el comportamiento de la cicatrización en una matriz dérmica acelular potenciada con ASCs. Para lograr esto fue necesario realizar un modelo experimental en ratas, desarrollando la técnica de obtención de ASCs de manera similar al protocolo que habíamos ensayado en lipoaspirado humano (Meruane et al., 2010).

Para cumplir con el primer objetivo específico que fue el de “desarrollar la técnica de obtención de ASCs en ratas”, se realizó una incisión en la región inguinal derecha de la rata, previamente anestesiada, disecando el panículo adiposo subcutáneo (1,4g), el cuál se cortó en múltiples fragmentos. Este proceso fue diferente si lo comparamos con la especie humana donde el tejido adiposo se obtiene mediante lipoaspirado, lo cuál genera fragmentos de tejido cuyo tamaño varían dependiendo del grosor de la cánula. (Zuk et al, 2001). Para el aislamiento de células troncales en la rata, el tejido adiposo fue fraccionado digerido con colagenasa, neutralizado con medio de cultivo y centrifugado. La concentración media de células troncales obtenida fué similar a la especie humana (1.95×10^5 células/ml) (Lee et al., 2004; Meruane et al., 2010). Nuestros resultados con respecto a este objetivo fueron exitosos ya que se logró una concentración celular muy similar a lo descrito para la especie humana. Sin embargo, el mayor aporte relacionado con este objetivo es que se deben introducir las siguientes dos modificaciones respecto al protocolo humano. 1° se requiere realizar una fragmentación previa, ya que no tiene el trauma de la lipoaspiración, y 2° es necesario aumentar la digestión con colagenasa a 60 minutos con 37°C, es decir el doble de tiempo, debido a lo compacto del tejido. El tiempo de doblaje celular es entre 2 a 4 días dependiendo del medio de cultivo y el pasaje en que se encuentre (Mitchell & McIntosh, 2006).

El segundo objetivo propuesto fue evaluar la adherencia de las ASCs a la matriz dérmica *in vitro*. El sustituto dérmico Integra se compone de una matriz de colágeno tipo I de bovino más glicosaminoglicanos de cartílago de tiburón formando una estructura porosa. Nuestra propuesta fue aumentar su eficiencia colocando sobre ellas ASCs, verificando que éstas se unan a la matriz dérmica. Debido a esto las células se sembraron "*in vitro*" en conjunto con un segmento de Integra®. Se encontró que hubo adherencia de las ASCs a la matriz dérmica Integra® a la 48 hrs de cultivo mediante visualización *in situ*, utilizando el microscopio óptico y tinción para fosfatasa alcalina, microscopía de fluorescencia con anticuerpo antivimentina-FITC, microscopía electrónica de barrido y por último mediante cortes histológicos con tinción tricrómica de Masson. Se demostró así la eficiencia de la técnica, pudiendo ésta ser un vehículo efectivo para su injerto en vivo. De esta manera se ha generado un armazón estructural con las células adheridas, que permite el transporte adecuado para una terapia celular. Esta técnica es innovadora en relación a la combinación Integra-ASCs, y ha resultado exitosa en nuestro estudio. Una experiencia similar ha sido descrita en la combinación dermis humana acelular-ASCs y (Alloderm®), verificando que las ASCs migran activamente en la superficie tridimensional de esta matriz dérmica (Altman et al., 2007; Liu et al., 2011). El modelo con la asociación Integra-ASCs ha demostrado que hay adherencia de las células ASCs al colágeno bovino y a los glicosaminoglicanos de cartílago de tiburón, esta observación se puede relacionar con el modelo de Altman et al (2007) que demuestra que las ASCs sembradas en la matriz dérmica e injertadas en vivo, persisten localmente y no se distribuyen sistémicamente, dando un soporte anatómico directo para la regeneración tisular en el sitio deseado.

Cabe destacar que el cultivo de ASCs en el implante lo realizamos con células frescas obtenidas directamente del pellet centrifugado, sin un proceso de expansión, ni purificación previo. La principal ventaja de esta modalidad es que se acorta el tiempo de preparación celular desde que se toma la muestra, siendo más práctico para un uso clínico.

A diferencia de algunos estudios que siembran las ASCs en la matriz dérmica por un corto período de tiempo, no mayor a tres horas (Nambu et al., 2007, 2009), nosotros hemos preferido la siembra por un período de 48 horas para aumentar la adhesividad de las ASCs a la matriz. Este mismo período de tiempo para la siembra ha sido utilizado en un estudio muy reciente con ASCs en Alloderm® (Orbay et al. 2011). Mientras que otros 2 estudios utilizan un período de tiempo intermedio de 24 horas (Altman et al., 2008, 2009; Shiyu et al., 2011).

Para desarrollar el tercer objetivo específico que corresponde a “evaluar el comportamiento histológico de la cicatrización en este modelo experimental”, se realizaron las técnicas histológicas Hematoxilina-Eosina y Tricrómica de Masson. Al revisar el comportamiento histológico de la matriz dérmica artificial en el tiempo, se verifican las 4 fases de integración descritas por Moiemmen et al. (2001) en humanos; Período de imbibición plasmática, período de migración fibroblástica, período de neovascularización y período de remodelamiento y maduración. En general el injerto es incorporado adecuadamente con mínima reacción a cuerpo extraño.

En relación al cuarto objetivo específico, en lo que respecta al “establecimiento de un marcador endotelial y la cuantificación de la densidad microvascular”, hemos observado que la siembra de ASCs en la matriz dérmica Integra® genera una mayor capacidad de vascularización local en vivo, que el injerto de Integra® solo. Siendo esta diferencia mayor a la tercera semana. Estos resultados son consistentes con otros estudios previos los cuales nos demuestran que las ASCs aportan potentes factores de crecimiento angiogénicos, entre estos se encuentran el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (b-FGF) y el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) entre otros (Rehman et al. 2004; Miranville et al., 2004; Wang et al. 2006). Y además, ya se ha comprobado el aumento de la vascularización al inyectar ASCs en colgajos cutáneos en ratas (Lu et al. 2008). Dos estudios previos que realizan una la combinación ASCs en una matriz dérmica acelular derivada de porcino, no encuentran que el uso de ASCs mejore la vascularización, al menos que exista una patología previa como uso de antomitóticos

o diabetes (Nambu et al. 2007, 2009). Al respecto, nuestros resultados favorables en la vascularización concuerdan con lo demostrado por Liu et al. quienes plantean que la combinación de ASCs en una matriz dérmica genera un efecto angiogénico sinérgico, y depende mucho del tipo de matriz utilizada la magnitud de este efecto. Más aún, la estructura y función de las diferentes moléculas de la matriz ayudan a la proliferación y secreción de factores de crecimiento de las ASCs (Liu et al., 2011). Adicionalmente, estos resultados son concordantes con otros estudios similares que han utilizando otros tipos de células troncales (Egaña et al., 2009; Salem et al., 2009).

Respecto al 4° objetivo específico, en lo que se refiere al “establecimiento de un marcador epidérmico para comparar formación epitelial”, se logró una inmunotinción adecuada de las citoqueratinas epidérmicas, pero no se logró encontrar que aumente la formación de epitelio en los sitios injertados con ASCs. Si bien existe una tendencia a una mayor migración del epitelio desde los bordes de la herida, este no es significativo, quizás porque el tiempo necesario para encontrar esta diferencia debió haber sido mayor. Experiencias previas logran demostrar que las ASCs se diferencian en epitelio, en estudios en vivo, de manera espontánea, su identificación se realiza mediante la transfección viral y la inclusión de una proteína fluorescente en las ASCs, demostrando que éstas se diferencian en líneas celulares epiteliales, vasculares y fibroblásticas (Altman et al., 2008, 2009). El punto crucial es que esta diferenciación fue observada a la cuarta semana de injerto, por lo tanto creemos ciertamente que habríamos llegado a un resultado similar. Evaluando esta circunstancia desde el punto de vista clínico, es poco útil esperar 4 semanas para empezar la diferenciación epitelial, por lo tanto se debiera optimizar la técnica antes de este período para acelerar el proceso.

Respecto a quinto objetivo específico que se refiere a la “cuantificación de la formación de colágeno”, cabe mencionar que el componente colagenoso de la dermis es el responsable de la fuerza y resistencia cutánea, normalmente el colágeno predominante es el tipo I en 85 a 95%, seguido del tipo III en 10 a 15%.

Una dermis sana debe tener una proporción y disposición adecuada de éstos. En este estudio hemos encontrado que el injerto de Integra® sembrado con ASCs aumenta la producción de colágeno tipo I versus el control sin ASCs, incluso esta diferencia es más acentuada a la tercera semana, demostrando que se ha acelerado la regeneración por esta vía y se ha generado una cicatriz de mejor calidad. La explicación a este suceso se encuentra en estudios previos que demuestran que las ASCs incrementan la síntesis de colágeno local activando vía paracrina la proliferación y migración de fibroblastos, mediado por factores como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) entre otros (Kim et al. 2007, 2009). Este efecto benéfico en la producción de colágeno es considerado como un terapia promisorio en fotoenvejecimiento (Kim et al., 2009)

X. Conclusión

Se acepta la hipótesis de trabajo planteada inicialmente, al demostrar que las ASCs en la matriz dérmica Integra® aceleran la cicatrización por múltiples vías. Una de éstas es la neovascularización, ya que la formación de nuevos vasos es necesaria para sostener la sobrevivencia de los queratinocitos y fibroblastos sobre el tejido de granulación. Por otro lado la secreción, por parte de las ASCs, de factores que estimulan a los fibroblastos a producir colágeno da soporte a la regeneración de esta nueva estructura cutánea.

Si bien estamos lejos de encontrar la célula mágica que nos permita regenerar el cuerpo humano, el camino hacia la creación de órganos *in vitro* está avanzando de manera importante. Ya se han logrado aislar células troncales en múltiples órganos del cuerpo humano y se han podido diferenciar y aplicar en forma terapéutica en múltiples modelos experimentales y clínicos. Esto sumado a la creciente utilización de células troncales para crear estructuras similares a órganos corporales, como la experiencia realizada en este estudio.

Es de esperar que el fenómeno regenerativo animal sea comprendido a cabalidad por la medicina dentro de un futuro cercano, para que de este modo se puedan aprovechar los potenciales beneficios que la célula tiene guardados desde los orígenes de la vida.

XI. Referencias

1. Ailhaud, G. & Grimaldi, P. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.* 12: 207-33, 1992
2. Altman, A.; Matthias, N., Yan, Y.; Song, Y., Bai, X.; Chiu, E., Slakey, P. & Alt, E. Dermal matrix as carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. *Biomaterial.* 29: 1431-1442, 2008.
3. Altman, A.; Yan, Y.; Matthias, N.; Bai, X.; Rios, C.; Mathur, A.; Song, Y. & Alt, E. Human adipose derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem Cells.* 27: 250-258, 2009.
4. Almeida, K. A.; Campa, A.; Alonso-Vale, M. I. C.; Lima, F. B.; Daud, E. D. & Stocchero, I. N. Fracción vascular estromal de tejido adiposo: cómo obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes: estudio preliminar. *Cir. Plást. Ibero-latinoam.* 34:71-9, 2008.
5. Alvarez, P. D.; García-Arranz, M.; Georgiev-Hristov, T.; García-Olmo, D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax.* 63: 374-6, 2008.
6. Andree, C.; Reimer, C.; Page, C.; Slama, J.; Stark, B. & Eriksson, E. Basement membrane formation during wound healing is dependent on epidermal transplants. *Plast. Reconstr. Surg.* 107: 97-104, 2001.
7. Atiyeh, B.S. & Costagliola, M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns.* 33: 405-413, 2007.
8. Ashjian, P. H.; Elbarbary, A. S.; Edmonds, B.; DeUgarte, D.; Zhu, M., Zuk, P. A.; Lorenz, H. P.; Benhaim, P. & Hedrick, M. H. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast. Reconstr. Surg.* 111: 1922-31, 2003.
9. ASPS. Procedures realized by the surgeons certified by the American Board of Plastic Surgery, 2007.

10. Bacou, F.; Boubaker el Andaloussi, R.; Daussin, P-A.; Micallef, J-P.; Levin, J. M.; Chammas, M.; Casteilla, L.; Reyne, Y. & Nougues, J. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant.* 13: 103–11, 2004.
11. Bely, A.E. & Nyberg, K.G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends in Ecology & Evolution.* 25: 161-170, 2010.
12. Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S. & Gehron Robey, P. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology and potential applications. *Stem Cells.* 19: 180-192, 2001.
13. Brzoska, M.; Geiger, H.; Gauer, S. & Baer, P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 142-50, 2005.
14. Burke, J.; Yannas, I.; Quinby, W.; Bondoc, C. and Junk, W. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann. Surg.* 194: 413, 1981.
15. Cao, Y.; Sun, Z.; Liao, L.; Meng, Y.; Han, Q. & Zhao, R. C. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 370-9, 2005.
16. Chester, D.; Balderson, D. & Papini, R. A review of keratinocyte delivery to wound bed. *J. Burn Care Rehab.* 25: 266-275, 2004
17. Choi, Y. S.; Park, S. N. & Suh, H. Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biomaterials.* 26: 5855-63, 2005.
18. Cui, L.; Liu, B.; Liu, G.; Zhang, W.; Cen, L.; Sun, J.; Yin, S.; Liu, W. & Cao, Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials.* 28: 5477-86, 2007.
19. Dicker, A.; Le Blanc, K.; Aström, G.; van Harmelen, V.; Götherström, C.; Blomqvist, L.; Arner, P. & Rydén, M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* 308: 283-90, 2005.

20. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, Dj. & Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4): 315-7, 2006.
21. Dragoo, J. L.; Choi, J. Y.; Lieberman, J. R.; Huang, J.; Zuk, P. A.; Zhang, J.; Hedrick, M. H. & Benhaim, P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J. Orthop. Res.* 21: 622-9, 2003.
22. Egaña, J.; Danner, S.; Kremer, M.; Rapoport, D.; Lohmeyer, J.A.; Dye, J.F.; Hopfner, U.; Lavandero, S.; Kruse, C. & Machens, H.G. The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials*. 30: 5918-5926, 2009.
23. Erickson, G. R.; Gimble, J. M.; Franklin, D. M.; Rice, H. E.; Awad, H. & Guilak, F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 763–9, 2002.
24. Estes, B. T.; Wu, A. W. & Guilak, F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum.* 54: 1222–32, 2006.
25. Fang, B. & Song, Y. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* 39: 3358-62, 2007.
26. Fraser, J. K.; Wulur, I.; Alfonso, Z. & Hedrick, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24: 150-4, 2006.
27. French, A.J.; Adams, C,A; Anderson, L.S; Kitchen, J.R.; Hughes, M.R. & Wood, S.H. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells*. 26: 485-93, 2008.
28. Friedenstein, A.J.; Deriglasova, U.F.; Kulagina, N.N.; Panasuk, A.F.; Rudakowa, S.F.; Luriá, E.A.; et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 2(2): 83-92, 1974.

29. Gallico III., G.; O'Connor, N.; Compton, C.; Kehinde, O. & Green, H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 311: 448-451, 1984.
30. Garcia-Olmo, D.; Herreros, D.; Pascual, M.; Pascual, I.; De-La-Quintana, P.; Trebol, J. & Garcia-Arranz, M. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int. J. Colorectal Dis.* 24: 27-30, 2009.
31. Geahart, J. New potential for human embryonic stem cells. *Science.* 282: 1061-2, 1998.
32. Gilbert, S.F. *Biología del Desarrollo.* Ed. Panamericana, Madrid, España, 2005.
33. Gilmore, G.L.; DePasquale, D.K.; Lister, J & Shadduck, R.K. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology.* 28(11): 1297-1305, 2000.
34. Gimble, J.; Katz, A. & Bunnell, B. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.*, 100: 1249-60, 2007.
35. Griffiths, M.; Ojeh, N.; Livingstone, R.; Price, R. & Navsaria, H. Survival of Apligraf in acute human wounds. *Tissue Eng.* 10: 1180-1195, 2004.
36. Halvorsen, Y. D.; Franklin, D.; Bond, A. L.; Hitt, D. C.; Auchter, C.; Boskey, A. L.; Paschalis, E. P.; Wilkison, W. O. & Gimble, J. M. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 7: 729-41, 2001.
37. Hausman, G. J. & Hausman, D. B. Search for the preadipocyte progenitor cell. *J. Clin. Invest.* 116: 3103-7, 2006.
38. Hicok, K. C.; Du Laney, T. V.; Zhou, Y. S.; Halvorsen, Y. D.; Hitt, D. C.; Cooper, L. F. & Gimble, J. M. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng.* 10: 371-80, 2004.
39. Hong, J. H. & Yaffe, M. A β -catenin-like molecule that regulates mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Cycle.* 5(2): 176-9, 2006.

40. Housman, T. S.; Lawrence, N.; Mellen, B. G.; George, M. N.; Filippo, J. S.; Cerveny, K. A.; DeMarco, M.; Feldman, S. R. & Fleischer, A. B. The safety of liposuction: results of a national survey. *Dermatol. Surg.* 28: 971-8, 2002.
41. Hoppman, R.; Meruane, M. et al. Remodelamiento Abdominal: Análisis y Técnica Empleada. XXXVI Simposio Anual Internacional de Cirugía Plástica-Estética, Puerto Vallarta, Jalisco, México, Noviembre, 2009.
42. Horwitz, E. M.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C.; Deans, R. J.; Krause, D. S.; Keating, A. & International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7(5): 393-5, 2005.
43. Jeng, J.C.; Fidler P.E.; Sokolich J.C.; Jaskille, A.D.; Khan S.; White P.M., et al. Seven years' experience with integra as reconstructive tool. *Journal of Burn Care and Research.* 28: 120-6, 2007.
44. Johnsen, S.; Ermuth, T.; Tanczos, E.; Bannasch, H.; Horcho, R.; Zschocke, I.; Peschen, M.; Schöpf, E.; Vanscheidt, W. & Augustin, M. The treatment of therapy-refractive ulcers of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant. *Vasa.* 34: 25-29, 2005.
45. Jones I.; James E.; Rubin P. & Martin R. Upward migration of cultured autologous keratinocytes in integra artificial skin: a preliminary report. *Wound. Rep. Reg.* 11: 132-138, 2003.
46. Junqueira, L.; Bignolas, G. & Bretani, R. Picrosirius plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem., J.* 11: 447-55, 1979.
47. Kang, S. K., Lee, D. H.; Bae, Y. C.; Kim, H. K.; Baik, S. Y.; Jung, J. S.; Kunlin, J. & Greenberg, D. A. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 183: 355-66, 2003.
48. Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Klüter, H. & Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24: 1294-301, 2006.

49. Kim, D. H.; Je, C. M.; Sin, J. Y. & Jung, J. S. Effect of partial hepatectomy on in vivo engraftment after intravenous administration of human adipose tissue stromal cells in Mouse. *Microsurgery*. 23: 424-31, 2003.
50. Kim, W.; Park, B.; Sung, J.; Yang, J., Park, S.; Kwak, S. & Park, J. Wound healind effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fribroblasts. *Journal of Dermatological Science*. 48: 15-24, 2007.
51. Kim, W.; Park, B.; Park, S.; Kim, H. & Sung, J. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *Journal of Dermatological Science*. 53: 96-102, 2009.
52. Knippenberg, M.; Helder, M. N.; Doulabi, B. Z.; Semeins, C. M.; Wuisman, P. I. & Klein-Nulend, J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue. Eng*. 11: 1780-8, 2005.
53. Komorowska-Timek, E.; Gabriel, A.; Bennett, D.; Miles D.; Garberoglio, C.; Cheng, C. & Gupta S. Artificial dermis as an alternative for coverage of complex scalp defects following excision of malignant tumors. *Plast. Reconst. Surg*. 115: 1010-17, 2005.
54. Lee, J.; Han, D. J. & Kim, S. C. In Vitro differentiation of human adipose tissue stem cells into cells with pancreatic phenotype by regenerating pancreas extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 375: 547-51, 2008.
55. Lee, R. H.; Kim, B.; Choi, I.; Kim, H.; Choi, H. S.; Suh, K.; Bae, Y. C. & Jung, J. S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow an adipose tissue. *Cell Physiol. Biochem*. 14: 311-24, 2004.
56. Lendeckel, S.; Jödicke, A.; Christophis, P.; Heidinger, K.; Wolff, J.; Fraser, J. K.; Hedrick, M. H.; Berthold, L. & Howaldt, H. P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J. Craniomaxillofac. Surg*. 32: 370-3, 2004.
57. Liu, S.; Zhang, H.; Zhang, X.; Lu, W.; Huang, X.; Xie, H.; Zhou, J; Wang, W.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Deng, Z. & Jin, Y. Synergistic Angiogenesis Promot-

- ing Effects of Extracellular Matrix Scaffolds and Adipose-Derived Stem Cells During Wound Repair. *Tissue Engineering Part A*. 17(5-6): 725-739, 2011.
58. Lu, F.; Mizuno, H.; Uysal, C.A.; Cai, X.; Ogawa, R. & Hyakusoku. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconst Surg*. 121(1): 50-58, 2008.
 59. Matsumoto, D.; Sato, K.; Gonda, K.; Takaki, Y.; Shigeura, T.; Sato, T.; Aiba-Kojima, E.; Iizuka, F.; Inoue, K.; Suga, H. & Yoshimura, K. Cell-assisted lipotransfer: Supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng*. 12: 3375-82, 2006.
 60. McGuckin, C.P.; Pearce, D., Forraz, N.; Tooze, J.A.; Watt, S.M. & Pettengell, R. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *European Journal of Haematology*. 71(5): 341-350, 2003.
 61. Meruane, M.; Rojas, M.; Castro, R. & Hoppmann, R. Técnica para la obtención y cultivo de células troncales adultas desde el tejido adiposo. *XII Congreso de Cirugía Plástica del Cono Sur Americano*, Viña del Mar, Octubre 2009.
 62. Meruane, M. & Rojas, M. Células troncales derivadas del tejido adiposo. *Int. J. Morph*. 28(3): 879-889, 2010.
 63. Meruane, M. & Rojas, M. Células troncales derivadas del tejido adiposo: técnica de obtención y utilidad en cirugía. *Rev. Chilena de Cirugía*. 63(2): 223-228, 2011.
 64. Mesimäki, K.; Lindroos, B.; Törnwall, J.; Mauno, J.; Lindqvist, C.; Kontio, R.; Miettinen, S. & Suuronen, R. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 38: 201-9, 2009.
 65. Miranville, A.; Heeschen, C.; Sengenès, C.; Curat, C. A.; Busse, R. & Bouloumié, A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 110: 349-55, 2004.

66. Mitalipova, M.M.; Rao, R.R.; Hoyer, D.M; Johnson, J.A.; Meisner, L.F.; Jones, K.L.; et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 23: 19-20, 2005.
67. Mitchell, J. & McIntosh, K. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 24: 376-85, 2006.
68. Mizuno, H.; Zuk, P. A.; Zhu, M.; Lorenz, H. P.; Benhaim, P. & Hedrick, M. H. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 109: 199–209, 2002.
69. Moiemmen, N.; Staiano, J.; Ojeh, N.; Thway, Y. and Frame, J. Reconstructive surgery with dermal regeneration template: clinical and histologic study. *Plast. Reconst. Surg.* 108: 93-103, 2001.
70. Nakagawa, H.; Akita, S.; Fukui, M; Fujii, T. & Akino, K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br. Journal of Dermatology.* 153: 29-36, 2005.
71. Nambu, M.; Kishimoto, S.; Nakamura, S.; Mizuno, H.; Yanagibayashi, S.; Yamamoto, N.; Azuma, R.; Nakamura, S.; Kiyosawa, T.; Ishihara, M. & Kanatani Y. Accelerated wound healing in healing-impaired mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann. Plast. Surg.* 62(3):317-21, 2009.
72. Nambu, M.; Ishiara, M.; Nakamura, S.; Mizuno, H.; Yanagibayashi, S.; Kanatani, Y.; Hattori, H.; Takase, B.; Ishizuka, T.; Kishimoto, S.; Amano, Y.; Yamamoto, N.; Azuma, R. & Kiyosawa, T. Enhanced healing of mitomycin c-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix. *Wound Repair Regen.* 15:505-10, 2007.
73. Orbay, H.; Takami, Y.; Hyakusoku, H. & Mizumo, H. Acellular dermal matrix seed with adipoe-derived stem cells as subcutaneous implant. *Aesth. Plast. Surg.* DOI 10.1007, 2011.
74. Planat-Bénard, V.; Menard, C.; André, M.; Puceat, M.; Perez, A.; Garcia-Verdugo, J. M.; Pénicaud, L. & Casteilla, L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ. Res.* 94: 223–9, 2004.

75. Puissant, B.; Barreau, C.; Bourin, P.; Clavel, C.; Corre, J.; Bousquet, C.; Taureau, C.; Cousin, B.; Abbal, M.; Laharrague, P.; Penicaud, L.; Casteilla, L. & Blancher, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* 129: 118-29, 2005.
76. Reddien, P. & Sanchez Alvarado, A. Fundamentals of planarian regeneration. *Annual review of cell and developmental biology.* 20: 725-757, 2004.
77. Rehman, J.; Traktuev, D.; Li, J.; Merfeld-Clauss, S.; Temm-Grove, C. J.; Bovenkerk, J. E.; Pell, C. L.; Johnstone, B. H.; Considine, R. V. & March, K. L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 109: 1292-1298, 2004.
78. Rigotti G, Marchi A, Galié M, Baroni G, Benati D, Krampera M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconst Surg.* 119: 1409-1422, 2007
79. Rodriguez, A. M.; Pisani, D. et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expresión in immunocompetent mdx Mouse. *J. Exp. Med.* 201: 1397-1405, 2005.
80. Rubio, D.; García –Castro, J.; Martín, M. C.; de la Fuente, R.; Cigudosa, J. C.; Lloyd, A. C. & Bernad, A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 65: 3035-9, 2005.
81. Safford, K. M.; Hicok, K. C.; Halvorsen, Y. D.; Wilkison, W. O.; Gimble, J. M. & Rice, H. E. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 371–9, 2002.
82. Salem, H.; Ciba, P.; Rapoport, D.; Egaña, J.; Reithmayer, K.; Kadry, M.; Machens, H. & Krause, C. The influence of pancreas-derived stem cells on scaffold bases skin regeneration. *Biomaterials.* 30: 789, 2009.
83. Schäffler, A. & Büchler, C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 25: 818-27, 2007.

84. Schenke-Layland, K.; Strem, B.; Jordan, M. C.; Deemedio, M. T.; Hedrick, M. H.; Roos, K. P.; Fraser, J. K. & Maclellan, W. R. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction. *J. Surg. Res.* 153: 217-23, 2009.
85. Seo, M. J.; Suh, S. Y.; Bae, Y. C. & Jung, J. S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328: 258-64, 2005.
86. Shannon, J. & Odelberg. Unraveling the molecular basis for regenerative cellular plasticity. *Journal. P. bio.* 2(8): 1068-71, 2004.
87. Shevchenko, R.V.; James, S.L. & James, E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available skin for reconstruction. *J. R. Soc. Interface.* 7: 229-258, 2010.
88. Shipper, M.; Marra, K. G.; Zhang, W.; Donnenberg, A. D. & Rubin, J. P. Regional anatomic age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann. Plast. Surg.* 60: 538-44, 2008.
89. Simon, H.; Nelson, C.; Goff, D.; Laufer, E.; Morgan, B.A. & Tabin, C. The differential expression of myogenic regulatory genes and *msx-1* during de-differentiation and redifferentiation of regenerating amphibian limbs. *Dev. Dynam.* 202: 1-12, 1995.
90. Singh, S.; Arora, R.; Handa, K.; Khraisat, A.; Nagajothi, N.; Molnar, J. & Khosla, S. Stem cells improve left ventricular function in acute myocardial infarction. *Clin. Cardiol.* 32: 176-80, 2009.
91. Sipp, D. Challenges in the clinical application of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 1: 9, 2010.
92. Stoick-Cooper, C.; Moon, R. & Weidinger, G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as prelude to regenerative medicine. *Genes & Development.* 21: 1292-1315, 2007.
93. Takahashi, M. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126: 663-76, 2006.

94. Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.; Waknitz, M.; Swiergiel, J.; Marshall, V. & Jones, J. Embryonic stem cells line derived from human blastocyst. *Science*. 282:1145-7, 1998.
95. Timper, K.; Seboek, D.; Eberhardt, M.; Linscheid, P.; Christ-Crain, M.; Keller, U.; Müller, B. Zulewski, H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 1135-40, 2006.
96. Tumber, T.; Guasch, G.; Greco, V.; Blanpain, C. Lowry, W.; Rendl, M. & Fuch, E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*. 303: 359-363, 2004.
97. Uccelli, A.; Pistoia, V. & Moretta, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?. *Trends Immunol.* 28(5): 221-6, 2007.
98. Uccioli, L. A clinical investigation on the characteristics and outcomes of treating chronic lower extremity wounds using the tissuetech autograft system. *Int. J. Low Extrem. Wounds.* 2: 140-151, 2003.
99. Uysal, A. C.; Mizumo, H.; Tobita, M.; Ogawa, R. & Hyakusoku, H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast. Reconstr. Surg.* 124(3): 804-15, 2009.
100. Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorge, W. & Ho, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33: 1402-16, 2005.
101. Wagner, J.E., Gluckman, E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin. Hematol.* 47(1): 3-12, 2010.
102. Wang, M.; Crisostomo, P.; Herring, C.; Meldrum, K. K.; Meldrum, D. R. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291: 880-4, 2006.

103. Wood, F.; Stoner, M.; Fowler B. & Fear M. The use of non-cultured autologous suspension and Integra dermal template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: one-step process. *Burns*. 33: 693-700, 2007.
104. Young, H. E.; Mancini, M. L.; Wright, R. P.; Smith, J. C.; Black, A. C. Jr.; Reagan, C. R. & Lucas, P. A. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev. Dyn.* 202: 137-44, 1995.
105. Yoshimura, K.; Sato, K.; Aoi, N.; Kurita, M.; Hirohi, T. & Harii, K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast. Surg.* 32: 48-55, 2008.
106. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizumo, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P. & Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211-28, 2001.