

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS



TESIS DOCTORAL

Mención de “Doctorado Europeo”

***MODIFICACIONES FENOTÍPICAS DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES PROCEDENTES DE LA GELATINA
DE WHARTON COMO BASE PARA SU UTILIZACIÓN
EN INGENIERÍA TISULAR VASCULAR***

BÁRBARA PÉREZ KÖHLER

2012

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS



TESIS DOCTORAL

Mención de “Doctorado Europeo”

**MODIFICACIONES FENOTÍPICAS DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES PROCEDENTES DE LA GELATINA
DE WHARTON COMO BASE PARA SU UTILIZACIÓN
EN INGENIERÍA TISULAR VASCULAR**

DIRECTORES:

Dra. Dña. Julia Buján Varela
Dr. D. Natalio García Honduvilla

BÁRBARA PÉREZ KÖHLER

2012

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno (1864-1936)

*A mis padres, a mis hermanos.
A Fernando.*

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Julia Buján Varela** y al **Dr. Natalio García Honduvilla**, Directores de esta Tesis. Julia, gracias por haberme brindado la oportunidad de formar parte de este equipo, por el cariño que me has ofrecido desde el primer día y por todo lo que he podido aprender de ti a lo largo de este tiempo, pero sobre todo, gracias por enseñarme a percibir las cosas con escepticismo y a usar mi propio criterio para valorarlas. Natalio, gracias por haber sido mi “padrino”, mi maestro, mi amigo, gracias por cada minuto que me has dedicado y por todo lo que me has enseñado en estos años, sencillamente...¡Gracias!

Quiero agradecer al **Dr. Juan Manuel Bellón Caneiro** no sólo el hecho de permitirme pertenecer a este grupo, sino también cada lección que me ha dado en estos años acerca de la investigación, y por cada día que me ha demostrado su preocupación por mi futuro profesional. Gracias Bellón por todo lo que me estás enseñando día a día.

Gracias también a la **Dra. Carmen Gianonatti Alias**, que siempre ha sido un apoyo para mí y para el resto de mis compañeros. Gracias por haber cuidado siempre de todos nosotros, Mamen.

Gracias al Centro de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Central de la Defensa “Gómez Ulla”, muy especialmente al **Dr. Felipe Sáinz** y a **Mónica Huecas**, sin los cuales no hubiéramos podido realizar una parte importante de nuestro estudio.

Tampoco hubiera podido llevar a cabo gran cantidad de experimentos de no haber contado con la ayuda de los Centros de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Alcalá. Quisiera agradecer muy especialmente a los técnicos **Antonio Priego** y **José A. Pérez** del Servicio de Microscopía Electrónica, **Isabel Trabado** y **Cristina Miguel** de la Unidad de Cultivos, y **Pilar Rubio** y **Olga Moreno** del Servicio de Biología Molecular. Gracias a todos por el tiempo que me habéis dedicado y lo muchísimo que me habéis ayudado.

Gracias al **Dr. Sakis Mantalaris**, profesor del *Biological Systems Engineering Laboratory (BSEL)* en *Imperial College London*, por permitirme realizar una estancia de investigación en su

laboratorio. Y mi agradecimiento en especial a la **Dra. Teresa Mortera Blanco** por haber sido mi profesora, compañera y amiga durante los meses que pasé allí y que nunca olvidaré.

Son muchas las personas que comparten conmigo cada día en el laboratorio y que ocupan un hueco muy especial, no sólo en mi trabajo, sino también en mi vida. Gracias a la **Dra. Gemma Pascual**, la **Dra. Marta Rodríguez**, la **Dra. Sandra Sotomayor**, **Alberto Cifuentes**, **Diana González** y **Soraya Martínez**, por todo el cariño, ayuda, apoyo, y sobre todo por la amistad que recibo de vosotros cada día. Me siento afortunada de que podamos compartir las alegrías y las penas siempre juntos, y quiero que sepáis que una parte de este trabajo es vuestra. ¡Gracias!

Gracias también a la **Dra. Verónica Gómez**, la **Dra. Cynthia Trejo**, la **Dra. M^a José Gimeno**, **Javier Martín** y **Carlos Vives**, porque aunque ya no estáis con nosotros, seguís siendo mis compañeros y amigos. Siempre habéis estado dispuestos a ayudarme en cada cosa que he podido necesitar, y sois una parte muy importante de mi vida. Os echo de menos en el laboratorio, ¡volved!

Gracias a mis amigos, muy especialmente a **María**, porque incluso desde el lejano Brasil no dejas de animarme y apoyarme cada día, pase lo que pase. Gracias también a **Nuria y Ariel**, sois un ejemplo de fortaleza para mí y siempre conseguís hacerme sentir que puedo con todo.

Y, por supuesto, quiero dedicar este trabajo a mi **familia**, a mi auténtico “cordón umbilical”. **Papá y mamá**, me lo habéis dado todo, vuestro apoyo incondicional me ha llevado hasta donde estoy hoy, y la palabra gracias no me alcanza para expresar lo que siento. Gracias a mis **hermanos**, siempre me he sentido apoyada por vosotros, y me siento muy feliz de poder dedicaros mi esfuerzo. Gracias también a mis **sobrinos**, que aunque últimamente paso poco tiempo con ellos siempre tienen la capacidad de alegrarme el día.

Por último, necesito dar las gracias a **Fernando**, mi marido. Quiero que sepas que nunca hubiera llegado hasta aquí sin ti. Gracias porque creer en mí, por animarme, apoyarme, gracias por haberme acompañado en todo este recorrido, a veces tan complicado...¡Gracias por estar siempre a mi lado!

Índice

ÍNDICE

Abreviaturas -----	15
Resumen -----	21
Summary -----	33
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN -----	43
1.1 El cordón umbilical -----	45
1.1.1 Origen embriológico del cordón umbilical -----	45
1.1.2 Citoarquitectura del cordón umbilical -----	46
1.2 El cordón umbilical como tejido fuente para la obtención de células -----	49
1.3 Células de la gelatina de Wharton -----	55
1.3.1 Aislamiento y expansión en cultivo de WJC -----	60
1.3.2 Caracterización de WJC -----	62
1.3.3 Potencial de diferenciación de WJC -----	65
1.4 Potencial de diferenciación endotelial de WJC -----	66
1.5 Ingeniería Tisular Vascular -----	71
1.5.1 Estructura y función de los vasos sanguíneos sanos -----	73
1.5.1.1 Túnica íntima -----	73
1.5.1.2 Túnica media -----	78
1.5.1.3 Túnica adventicia -----	79
1.5.1.4 Matriz extracelular -----	80
1.5.2 Daño arterial y reparación -----	82

1.5.3 Biomateriales de ePTFE como sustitutos vasculares -----	89
1.5.4 Perspectivas de futuro en la sustitución vascular -----	92
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS DE TRABAJO Y DISEÑO EXPERIMENTAL -----	95
CAPÍTULO 3: OBJETIVO 1: MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> -----	103
3.1 Objetivo 1 -----	105
3.2 Material y métodos -----	106
3.2.1 Preparación de medios de cultivo y enzimas proteolíticas -----	106
3.2.1.1 Medio Mínimo Esencial (MEM) -----	106
3.2.1.2 Medio 199 (M199) -----	106
3.2.1.3 Medio 199 sin factor de crecimiento (M199 sin ECGS) -----	107
3.2.1.4 Medio AmnioMAX™-C100 -----	107
3.2.1.5 Medio Eagle modificado de Dulbecco sin suero -----	107
3.2.1.6 Solución salina equilibrada de Hank (HBSS) -----	108
3.2.1.7 Colagenasa tipo I -----	108
3.2.1.8 Tripsina-EDTA -----	108
3.2.2 Aislamiento de células de cordón umbilical -----	108
3.2.2.1 Aislamiento de células endoteliales de vena umbilical -----	109
3.2.2.2 Aislamiento de células de la gelatina de Wharton -----	112
3.2.3 Técnicas básicas de cultivo celular -----	116
3.2.3.1 Cultivo celular -----	116
3.2.3.2 Subcultivo celular -----	117
3.2.3.3 Recuento celular -----	119

3.2.4 Inducción de la diferenciación de WJC hacia la línea endotelial -----	121
3.2.5 Crecimiento, proliferación y viabilidad celular -----	122
3.2.5.1 Curvas de crecimiento celular -----	122
3.2.5.2 Proliferación celular a tiempo real -----	122
3.2.5.3 Viabilidad celular -----	123
3.2.6 Citometría de flujo -----	125
3.2.7 Análisis de la expresión génica -----	127
3.2.7.1 Extracción de RNA -----	127
3.2.7.2 Transcripción inversa -----	130
3.2.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real -----	131
3.2.8 Determinación de los niveles de prostaciclina -----	134
3.2.9 Evaluación de la actividad telomerasa -----	135
3.2.10 Estudios histológicos -----	138
3.2.10.1 Hematoxilina-eosina (HE) -----	139
3.2.10.2 Tricrómico de Masson (TM) -----	140
3.2.10.3 Rojo Sirio (RS) -----	140
3.2.11 Estudios de inmunofluorescencia -----	140
3.2.12 Microscopía electrónica de transmisión (MET) -----	144
3.2.13 Análisis estadístico -----	145
3.3 Resultados -----	146
3.3.1 Histología del cordón umbilical -----	146
3.3.2 Morfología de HUVEC en cultivo -----	149

3.3.3 Morfología de WJC en cultivo -----	152
3.3.4 Morfología de Dif-WJC en cultivo -----	157
3.3.5 Diferencias morfológicas entre WJC y Dif-WJC -----	161
3.3.6 Crecimiento, viabilidad y proliferación de WJC, Dif-WJC y HUVEC -----	161
3.3.7 Inmunofenotipo de WJC y Dif-WJC -----	167
3.3.8 Estudios inmunocitoquímicos -----	170
3.3.9 Producción de 6-ketoprostaglandina-F _{1α} -----	184
3.3.10 Expresión génica -----	186
3.3.11 Actividad telomerasa -----	192
3.4 Resumen de resultados objetivo 1 -----	193
CAPÍTULO 4: OBJETIVO 2: MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> -----	195
4.1 Objetivo 2 -----	197
4.2 Material y métodos -----	198
4.2.1 Diseño de los equivalentes tisulares -----	198
4.2.1.1 Componentes del equivalente tisular o constructo vascular -----	198
4.2.1.2 Siembra celular en biomaterial plano (sistema estático) -----	199
4.2.1.3 Siembra celular en biomaterial tubular (sistema dinámico) -----	200
4.2.1.4 Circuito de flujo pulsátil -----	203
4.2.2 Validación de los equivalentes tisulares en un modelo animal -----	204
4.2.2.1 Animal de experimentación -----	204
4.2.2.2 Establecimiento de los grupos experimentales -----	205
4.2.2.3 Protocolo preoperatorio y técnica anestésica -----	207

4.2.2.4 Procedimiento quirúrgico -----	207
4.2.3 Estudios histológicos -----	210
4.2.4 Estudios inmunohistoquímicos -----	210
4.2.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB) -----	212
4.3 Resultados -----	213
4.3.1 Evaluación de las siembras celulares -----	213
4.3.2 Evaluación de los implantes vasculares -----	221
4.3.2.1 Grupo experimental I: ePTFE control -----	223
4.3.2.2 Grupo experimental II: ePTFE + HUVEC -----	226
4.3.2.3 Grupo experimental III: ePTFE + WJC -----	230
4.3.2.4 Grupo experimental IV: ePTFE + Dif-WJC -----	237
4.3.3 Cuantificación de la hiperplasia intimal -----	241
4.3.4 Reacción macrofágica -----	246
4.3.5 Remodelación de la pared protésica -----	248
4.4 Resumen de resultados objetivo 2 -----	252
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN -----	255
5.1 Modelo experimental <i>in vitro</i> -----	257
5.1.1 Aislamiento de células del cordón umbilical -----	257
5.1.2 Caracterización fenotípica de HUVEC -----	259
5.1.3 Caracterización fenotípica de WJC -----	260
5.1.4 Modificaciones fenotípicas de WJC (Dif-WJC) -----	263
5.1.5 Inmunofenotipo de WJC y Dif-WJC -----	265

5.1.6 Crecimiento, proliferación y viabilidad de WJC y Dif-WJC -----	268
5.1.7 Actividad telomerasa -----	269
5.1.8 Eficacia de la diferenciación endotelial -----	270
5.2 Modelo experimental <i>in vivo</i> -----	276
5.2.1 Selección del modelo experimental -----	276
5.2.2 Modificación de la superficie protésica -----	279
5.2.3 Uso del ePTFE en la elaboración de constructos vasculares -----	282
5.3 Consideraciones finales y perspectivas de futuro -----	292
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES -----	295
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA -----	301
CAPÍTULO 8: ANEXOS -----	361

Abreviaturas

ABREVIATURAS

aFGF	Factor de crecimiento fibroblástico ácido
APC	Aloficocianina
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Cúmulo de diferenciación
CFS	Carboxifluoresceína
CK	Citoqueratina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CXCL	Quimiocina de tipo CXC y con ligando
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
Dif-WJC	Células de la gelatina de Wharton diferenciadas
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DNasa	Desoxirribonucleasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
ECGS	Suplemento para el crecimiento de células endoteliales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunosorción ligado a enzimas

eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ePTFE	Politetrafluoroetileno expandido
FBS	Suero fetal bovino
Flt-1/VEGFR-1	Receptor de tipo 1 del VEGF
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
IF	Inmunofluorescencia
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico de tipo 1
IH	Inmunohistoquímica
KDR/VEGFR-2	Receptor de tipo 2 del VEGF
M199	Medio 199
MAPG	Glicoproteínas asociadas a microfibrillas
MEB / SEM	Microscopía electrónica de barrido
MEM	Medio mínimo esencial
MET / TEM	Microscopía electrónica de transmisión
M-MLV	Enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney
mRNA	RNA mensajero
Oligo-dT	Oligo-desoxitimidina

PBS	Tampón fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PEGF	Factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario
PerCP	Conjugado de la proteína clorofil peridina
pNpp	p-nitrofenil fosfato
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RNasa Out	Inhibidor de RNasas
RT	Transcripción inversa
RTCA	Análisis de proliferación celular a tiempo real
RS	Rojo Sirio
TGF-α	Factor de crecimiento transformante tipo α
TGF-β	Factor de crecimiento transformante tipo β
TM	Tricrómico de Masson
Tm	Temperatura de fusión
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
vWF	Factor von Willebrand
WJC	Células de la gelatina de Wharton

Resumen

RESUMEN

La gelatina de Wharton del cordón umbilical es un tejido conjuntivo de aspecto mixomatoso que se dispone alrededor de los vasos umbilicales (una vena, dos arterias), protegiéndolos de las fuerzas compresivas generadas por los movimientos fetales y las contracciones uterinas. Aunque este tejido está compuesto fundamentalmente por componentes de la matriz extracelular -en especial colágeno y ácido hialurónico-, contiene una población de células de aspecto mesenquimatoso denominadas células de la gelatina de Wharton (WJC).

La manipulación del cordón umbilical con el fin de aislar las WJC es relativamente sencilla, no invasiva, y apenas conlleva controversias éticas, al tratarse de un tejido extraembrionario que se descarta de forma rutinaria tras el parto. Esto hace que la gelatina de Wharton sea una fuente de obtención celular atractiva en comparación con otras fuentes más clásicas, como los aspirados de médula ósea.

Las WJC constituyen una población celular que cumple una serie de requisitos que las permiten ser clasificadas en la categoría de células madre mesenquimales. Bajo condiciones *in vitro*, estas células presentan, de forma general, morfología elongada, crecimiento adherente, capacidad proliferativa, expresión positiva para diversos marcadores relacionados con el fenotipo mesenquimal, y potencial de diferenciación multilinaje. Las propiedades que estas células presentan en cultivo han podido ser comprobadas en multitud de modelos experimentales *in vivo*, lo que ha permitido a la comunidad científica valorar su uso en diversas aplicaciones de Ingeniería Tisular.

En este sentido, una de las posibles aplicaciones terapéuticas de las WJC podría encontrarse bajo el marco de la Ingeniería Tisular Vascular, más concretamente en el diseño de equivalentes tisulares destinados a la reparación arterial. En la actualidad, las patologías vasculares representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el ser humano, lo que conlleva la necesidad de disponer de un sustituto

vascular adecuado que pueda emplearse en el tratamiento y reparación de dichas patologías.

Para llevar a cabo el diseño del sustituto vascular “ideal”, es necesario combinar una serie de elementos que permitan elaborar un constructo cuyas propiedades físicas y mecánicas sean similares a las presentes en el vaso nativo. En primer lugar, se precisa del uso de un soporte estructural (biomaterial de origen biológico o sintético) que actúe a modo de andamio, permitiendo la integración tisular del injerto y la remodelación de la pared vascular, mediada por la migración y proliferación de células musculares lisas, junto con el depósito de componentes de la matriz extracelular. La eficacia de este soporte puede verse incrementada si se combina con el uso de señales (factores de crecimiento, moléculas de adhesión, estímulos mecánicos, etc.) y células que recubran la superficie luminal del biomaterial, reduciendo el riesgo de trombosis y ayudando a modular el proceso cicatrizal desencadenado tras el implante (hiperplasia intimal).

Las prótesis de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) representan uno de los biomateriales más utilizados en cirugía vascular. Su rendimiento es óptimo cuando se emplean en la reparación arterial de vasos de gran o mediano calibre (diámetro interno superior a 6 mm), pero disminuye notablemente cuando el calibre del vaso es pequeño (diámetro interno inferior a 6 mm) debido a dos problemas principales: trombosis y reestenosis. Una de las estrategias diseñadas a fin de disminuir la trombosis de estas prótesis, consiste en el recubrimiento de su superficie luminal con una siembra de células endoteliales. Estas células constituyen la interfaz natural entre la sangre y los tejidos, y tienen propiedades antiadherentes y antiagregantes, lo que incrementa la eficacia del constructo vascular. Sin embargo, el uso de estas células está condicionado a la disponibilidad de una fuente de obtención celular adecuada (autóloga o heteróloga), situación que genera la necesidad de localizar otra estirpe celular candidata que pueda emplearse como alternativa a la utilización de las células endoteliales.

Por estas razones, y dado el interés que las WJC han suscitado en los últimos años, nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

“¿Son las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical una estirpe celular mesenquimal capaz de diferenciarse hacia la línea endotelial?”.

“¿Pueden estas células mejorar la permeabilidad de las prótesis de ePTFE de pequeño calibre?”.

Para dar respuesta a estas hipótesis, hemos diseñado un modelo experimental dividido en dos objetivos:

1. En nuestro **primer objetivo**, diseñamos un modelo de estudio *in vitro* con el fin de caracterizar las WJC desde un punto de vista morfológico, fenotípico y funcional durante los primeros cinco subcultivos, y valoramos las modificaciones fenotípicas de estas células en presencia de un estímulo exógeno de diferenciación endotelial (Dif-WJC), comparándolas con un grupo control formado por células endoteliales procedentes de la vena umbilical (HUVEC).
 - En primer lugar, aislamos las poblaciones HUVEC y WJC del cordón umbilical, cultivando a continuación las HUVEC con medio M199 (medio enriquecido con factor de crecimiento de células endoteliales) y las WJC con AmnioMAX™-C100 (medio idóneo para el cultivo de células de tipo indiferenciado). Mantuvimos las células en cultivo hasta el quinto subcultivo, y seleccionamos los subcultivos primero, tercero y quinto para llevar a cabo los diferentes análisis morfológicos y fenotípicos (inmunofluorescencia, citometría de flujo, MET), así como los estudios de viabilidad (Azúl Tripán, AlamarBlue®, proliferación (RTCA), síntesis de sustancias (ELISA), y expresión génica (qRT-PCR).

- Paralelamente, sometimos diversos cultivos de WJC a un estímulo exógeno de diferenciación endotelial, mediante el cultivo de estas células con medio M199. Utilizando la misma metodología que en el caso anterior, estudiamos las modificaciones fenotípicas de esta nueva población (Dif-WJC) en los subcultivos primero, tercero y quinto, comparando los resultados con los observados en la estirpe indiferenciada (WJC) y las propias HUVEC.
2. En nuestro **segundo objetivo**, diseñamos una serie de constructos vasculares, utilizando biomateriales tubulares de ePTFE (4 mm de diámetro interno y 30 μm de distancia internodal), en cuya superficie luminal (pretratada con fibronectina) sembramos las distintas estirpes celulares (HUVEC, WJC, Dif-WJC), con el fin de validar la efectividad de la siembra bajo condiciones experimentales *in vitro*, y la eficacia de los distintos sustitutos vasculares diseñados utilizando para ello un modelo *in vivo* de sustitución arterial.
- Los grupos experimentales diseñados para desarrollar este objetivo fueron:
 - I. ePTFE control (sin siembra celular)
 - II. ePTFE + HUVEC
 - III. ePTFE + WJC
 - IV. ePTFE + Dif-WJC
 - Para llevar a cabo la siembra celular, recubrimos la superficie luminal de los biomateriales con una solución de fibronectina a concentración 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, facilitando así la adhesión celular. A continuación, sembramos las células sobre el ePTFE, y evaluamos la eficacia de la misma bajo condiciones de cultivo estáticas (24 h, 48 h, 7 d) y dinámicas (1 h), al someter los constructos a un circuito de flujo pulsátil (MEB).

- Utilizamos los constructos de los diferentes grupos experimentales en un modelo de sustitución en la arteria femoral común de perros de raza Beagle, durante periodo de estudio de 60 días. Una vez finalizado el tiempo de estudio, llevamos a cabo los análisis morfológicos (MEB), morfométricos (mediciones) e histológicos (tinciones, inmunohistoquímica) pertinentes con el fin de evaluar los procesos de reparación arterial.

Los **resultados** que obtuvimos tras analizar el comportamiento de las distintas estirpes celulares en cultivo revelaron que las HUVEC constituyen una población endotelial muy diferenciada, con una intensa expresión (a nivel génico y proteico) de una serie de marcadores clave de la línea endotelial (CD31, CD34, vWF). Aunque estas células no producen factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interaccionan con él a través de los receptores Flt-1 y KDR (receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, respectivamente), cuya expresión pudimos confirmar por inmunofluorescencia y por qRT-PCR. Estas células tienen un potencial proliferativo limitado, debido a su estadio de maduración, y una gran capacidad de síntesis y liberación de un intermediario de la prostaciclina (6-keto-prostaglandina- $F_{1\alpha}$), que disminuye gradualmente entre el primer y el quinto subcultivo.

Por su parte, observamos que las WJC son una población celular cuyas características fenotípicas y citoesqueléticas se encuentran a medio camino entre la célula fibroblastoide y la miofibroblastoide, su aspecto es aspecto fusiforme y presentan un citoesqueleto con filamentos de α -actina de músculo liso y desmina. Tienen expresión génica positiva para los factores de transcripción Nanog y Oct-4, implicados en la capacidad de autorrenovación y el potencial de diferenciación celular, hecho que se corresponde con la capacidad proliferativa y viabilidad observadas entre el primer y el quinto subcultivo. Su inmunofenotipo reveló que son células de tipo mesenquimal no hematopoyéticas, al presentar en su superficie las proteínas CD105, CD146 y CD90, con la particularidad de que el porcentaje de expresión de los marcadores CD105 y

CD146 disminuye gradualmente a medida que avanzan los subcultivos, tornándose negativas en el quinto subcultivo. Son células productoras de VEGF, con un mecanismo de retroalimentación positiva regulado, aparentemente, por el receptor de tipo 1 (Flt-1).

Al cultivar estas células con un medio de diferenciación endotelial, pudimos observar unas modificaciones fenotípicas que provocan que las Dif-WJC pierdan el aspecto fusiforme y se vuelvan poligonales. Estas células experimentan un incremento en los filamentos de desmina, aproximando su fenotipo hacia la línea miofibroblastoide. Las células aumentaron su volumen citoplasmático, y redujeron su capacidad proliferativa, aunque los niveles de viabilidad celular se mantuvieron semejantes a los de WJC entre el primer y el quinto subcultivo. La expresión de los factores de transcripción Nanog y Oct-4 se redujo ligeramente en comparación con las células indiferenciadas, aunque las Dif-WJC mantuvieron una capacidad multipotente en el quinto subcultivo. A pesar del estímulo exógeno de diferenciación endotelial, estas células no mostraron expresión de CD31, CD34, vWF, ni liberaron al medio de cultivo 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$.

Tras observar el comportamiento de estas estirpes en cultivo, seleccionamos el primer subcultivo como el más adecuado para ser utilizado en un modelo experimental de sustitución arterial. El diseño y fabricación de los diferentes constructos vasculares se llevó a cabo mediante la siembra de células de cada tipo celular (HUVEC, WJC, Dif-WJC) sobre la superficie luminal de biomateriales tubulares de ePTFE pretratados con una solución de fibronectina. Sometimos los diferentes constructos artificiales a condiciones de cultivo estáticas y dinámicas, y comprobamos que el comportamiento de la siembra era muy semejante en los tres grupos experimentales (con la única diferencia de la disposición en monocapa de las HUVEC, y en multicapa de las WJC y las Dif-WJC): las células formaban una capa que tapizaba el lumen protésico a las 24 h post-siembra, se mantenía estable a las 48 h, y mostraba evidentes signos de degeneración a partir de los 7 días de cultivo. Cuando los constructos se sometieron a

circuito de flujo pulsátil durante 1 h, éste provocó la denudación celular del 70-80% en todos los grupos experimentales, demostrando la gran influencia de las fuerzas de cizallamiento del flujo sobre la estabilidad de la capa celular sembrada en el biomaterial.

Llevamos a cabo el modelo de sustitución arterial utilizando perros de raza Beagle, implantando segmentos de 4 cm de longitud de los constructos vasculares en la arteria femoral común izquierda o derecha, dependiendo de cada grupo experimental. El análisis morfológico e histológico llevado a cabo a los 60 días post-implante reveló que los constructos de ePTFE sin siembra celular (grupo control) tenían el mayor índice de fracaso (75% de oclusión), y una hiperplasia intimal superior a la de los demás grupos experimentales. Los constructos sembrados con HUVEC presentaron el menor índice de fracaso (25% de oclusión) y una hiperplasia intimal significativamente menor que la del grupo control. En ambos casos pudimos observar un espesor creciente de esta hiperplasia entre las anastomosis proximal y distal. El comportamiento de los grupos experimentales sembrados con WJC y Dif-WJC mejoró lo observado en el grupo control (55% y 50% de oclusión, respectivamente), aunque no fueron tan efectivos como el grupo sembrado con HUVEC. Sin embargo, ambos grupos experimentales desarrollaron una hiperplasia intimal de espesor más o menos homogéneo entre los extremos proximal y distal.

Observamos una colonización del constructo similar en los cuatro grupos experimentales, destacando: la moderada infiltración celular en el interior del ePTFE (especialmente en los tercios luminal y adventicial); la leve reacción macrofágica (salvo en las zonas perianastomóticas donde se incrementa la presencia de macrófagos activados); y la formación de una capa neoadventicial con células de aspecto fibroblastoide, microvasculatura y abundante cantidad de colágeno de tipo I.

Gracias a los resultados obtenidos, podemos **concluir** que:

- Bajo nuestras condiciones experimentales, las células de la gelatina de Wharton (WJC) presentan un perfil fenotípico con características de células mesenquimales comprometidas hacia la línea fibroblástica.
- El protocolo empleado para llevar a cabo la diferenciación endotelial no ha mostrado eficacia en su objetivo, ya que la población celular condicionada resultante (Dif-WJC) ha continuado su progresión y maduración desde la línea fibroblástica hacia la miofibroblástica.
- Las distintas poblaciones celulares estudiadas (HUVEC, WJC, Dif-WJC) poseen un patrón de comportamiento similar, dando lugar a la formación de una cobertura celular sobre la superficie luminal del ePTFE.
- La trombogenicidad de los constructos se ve reducida ante la interposición de una capa celular en la interfaz sangre-biomaterial. La eficacia de la túnica sembrada aumenta significativamente en el caso de las células endoteliales, en comparación con las células de la gelatina de Wharton, ya sea la población celular indiferenciada o la condicionada a diferenciación.
- La respuesta reparadora, medida como hiperplasia intimal o reestenosis arterial, disminuye con la siembra celular. De los distintos grupos estudiados, el que ha presentado un mejor comportamiento, no sólo en cuanto a la obtención de una capa neointimal estable, sino también a su grado de desarrollo que favorezca el mantenimiento de la permeabilidad en el injerto, ha sido el grupo experimental con siembra de células de la gelatina de Wharton diferenciadas (Dif-WJC).

Todo lo anterior nos permite rechazar nuestra primera **Hipótesis** planteada:

“¿Son las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical una estirpe celular mesenquimal capaz de diferenciarse hacia la línea endotelial?”

Afirmando que, bajo las condiciones experimentales diseñadas, las células de la gelatina de Wharton constituyen una población celular de tipo mesenquimal determinada hacia la línea conjuntiva, y no sensible a un medio de diferenciación endotelial.

Por el contrario, podemos elevar nuestra segunda **Hipótesis** planteada:

“¿Pueden estas células mejorar la permeabilidad de las prótesis de ePTFE de pequeño calibre?”

A la categoría de **Tesis**, afirmando que:

Las células mesenquimales diferenciadas de la gelatina de Wharton favorecen la formación de una capa neointimal de menor espesor y de características más estables que las otras estirpes celulares estudiadas, lo que podría permitir a estas células colaborar en la reducción de los procesos de reestenosis desencadenados en la prótesis vascular.

Summary

SUMMARY

The Wharton's jelly of the umbilical cord is a mixomatous connective tissue that surrounds the umbilical vessels (one vein, two arteries), protecting them from the compression forces generated due to the fetal movements and the uterine contractions. Although this tissue is mainly composed of extracellular matrix components -specially collagen and hyaluronic acid-, it contains a population of cells with mesenchymal-like shape known as Wharton's jelly cells (WJC).

Handling umbilical cord in order to isolate WJC is a relatively easy, non-invasive procedure, and it does not carry almost any ethical controversies, since it is an extraembryonic tissue routinely discarded after delivery. These facts make the Wharton's jelly an attractive source of cells in comparison with other classical sources, like bone marrow aspirates.

WJC constitutes a cell population that fulfills some requirements that allow them to be classified as mesenchymal stem cells. Under *in vitro* conditions, these cells generally present elongated morphology, adherent growth, proliferative capacity, positive expression for several markers related to mesenchymal phenotype, and multilineage differentiation potential. The properties that these cells show in culture have been corroborated in plenty of *in vivo* experimental models, allowing the scientists to validate their potential use in different Tissue Engineering applications.

In this regard, one of the possible therapeutic applications of WJC could be found in the Vascular Tissue Engineering field, specifically in designing tissue equivalents focused on the arterial wall repair. Currently, vascular pathologies represent one of the major morbidity and mortality reasons of the human being, which entails the need of having an adequate vascular substitute to be used in the treatment and healing of these pathologies.

In order to design the “ideal” vascular substitute, it is compulsory to combine some elements that allow us to create a construct whose physical and mechanical properties are as similar as the native vessel’s. First of all, it is necessary to use a scaffold (biologic or synthetic biomaterial) that enhances both tissue integration and vascular wall remodelling processes, guided by the migration and proliferation of smooth muscle cells, and extracellular matrix components deposition. The performance of this scaffold can be increased if it is used in combination with signals (growth factors, adhesion molecules, mechanical stimuli, and so on) and cells that cover the inner surface of the biomaterial, reducing the risk of thrombosis and cooperating in the healing process activated after the graft implant (intimal hyperplasia).

Expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts are one of the most commonly used biomaterials in vascular surgery. It has an optimal performance when used in the repair of high and medium caliber arteries (inner diameter larger than 6 mm), but it behaves noticeably worse when the caliber is small (inner diameter shorter than 6 mm), due to two main complications: thrombosis and restenosis. One of the different strategies designed in order to increase the performance of this kind of devices is the seeding of an endothelial layer that covers the luminal surface of the biomaterial. Endothelial cells represent the natural interface between the blood and the tissues, and they have antiadherent and antiaggregative properties, which increases the effectiveness of the vascular construct. In spite of this, the use of this cell population is conditioned by the availability of an optimal cell source (autologous or heterologous), which leads to the need of searching for another cell type suitable for being used as an alternative to endothelial cells.

For all these reasons, and due to the interest that WJC have raised during the last years, we have proposed the following hypotheses:

“Are umbilical cord Wharton’s jelly cells a mesenchymal cell population with the ability to differentiate towards the endothelial lineage?”

“Can these cells improve the patency of small caliber ePTFE vascular grafts?”

In order to contrast these hypotheses, we have carried out an experimental model divided into two objectives:

1. In our **first objective**, we designed an *in vitro* experimental model in order to characterize the WJC population during passages 1 to 5, from a morphological, phenotypical and functional point of view, and we assessed the phenotypical modifications of these cells when they are exposed to an exogenous endothelial differentiation stimulus (Dif-WJC), comparing them with a control group consisting of endothelial cells of the umbilical vein (HUVEC).
 - First, we isolated both HUVEC and WJC from umbilical cords, and cultured HUVEC in M199 medium (supplemented with endothelial cell growth supplement) and WJC in AmnioMAX™-C100 (optimal medium for the growth of undifferentiated cells). We kept the cells in culture until they reached the 5th passage, and selected the 1st, 3rd and 5th passages to carry out the morphological and phenotypical analyses (immunofluorescence, flow cytometry, TEM), as well as cell viability (Trypan Blue, AlamarBlue®), proliferation (RTCA), protein synthesis (ELISA), and gene expression (qRT-PCR).
 - Simultaneously, we set several WJC cultures and exposed them to an exogenous endothelial differentiation stimulus, culturing these cells in M199

medium. Using the same methodology, we studied the phenotypical changes of this new population (Dif-WJC) during the 1st, 3rd and 5th passages, in comparison with their undifferentiated counterparts (WJC) and HUVEC.

2. In our **second objective**, we designed some vascular constructs, using tubular ePTFE grafts (4 mm inner diameter and 30 μ m internodal space), in whose luminal surface (precoated with fibronectin) we seeded the different cell populations (HUVEC, WJC, Dif-WJC), in order to assess the effectiveness of the cell seeding under *in vitro* conditions, and the efficacy of the different vascular constructs in an experimental *in vivo* model of arterial replacement.

- The experimental groups were designed as follows:
 - I. ePTFE control (no cell seeding)
 - II. ePTFE + HUVEC
 - III. ePTFE + WJC
 - IV. ePTFE + Dif-WJC

- In order to perform the cell seeding, we coated the inner surface of the ePTFE with a 20 μ g/mL fibronectin solution to enhance the cellular adhesion. Following this, we seeded the cells onto the ePTFE and assessed its performance under static conditions (24 h, 48 h, 7 d), and dynamic conditions (1 h), while interposing the constructs into a pulsatile flow circuit (SEM).

- We applied the different equivalents in an experimental model of arterial replacement of the common femoral artery during a period of time of 60 days, and using Beagle dogs as experimental animal. By the end of the study time, we performed morphological (SEM), morphometric (measures), and histological (stainings, immunohistochemistry) analyses in order to evaluate the arterial healing process.

The **results** that we obtained with the different analyses revealed that HUVEC constitutes a mature and differentiated cell population, with an intense expression (at both gene and protein levels) of several endothelial-specific markers (CD31, CD34, vWF). Although these cells do not produce vascular endothelial growth factor (VEGF), cells interact with this factor through the VEGF receptors Flt-1 and KDR (VEGFR-1 and VEGFR-2, respectively), whose expression was validated using immunofluorescence and qRT-PCR techniques. These cells have a limited proliferative potential, due to their condition of highly mature cells, and they show high capacity to synthesize and secrete a metabolic intermediate of prostacyclin (6-keto-prostaglandin- $F_{1\alpha}$), that gradually decreases between 1st and 5th passages.

We could observe that WJC are cells whose phenotypical and cytoskeletal properties are situated between fibroblastic and miofibroblastic lineages; they have a spindle-shaped morphology and present a cytoskeleton with α -smooth muscle actin and desmin filaments. They have positive gene expression for Nanog and Oct-4, transcription factors related to self-renewal and differentiation potential, which correlates to the viability and proliferative status observed between the 1st and the 5th passages. Their immunophenotype revealed that these cells are non hematopoietic mesenchymal stem cells, since they express CD105, CD146 and CD90, with the particularity that the percentage of expression of CD105 and CD146 gradually decreases after every passage and seems to be negative at the 5th passage. They are VEGF producing cells, with a positive feedback apparently regulated through the type 1 receptor, Flt-1.

While culturing these cells in an endothelial differentiation medium, we could observe some phenotypical changes that made Dif-WJC lose their spindle-shaped morphology and become polygonal. These cells presented an increase of desmin filaments, approaching their phenotype towards the myofibroblastic lineage. Cells showed an increase of their cytoplasmic volume and decreased their proliferation rates, although the viability levels remained constant and similar to WJC between the 1st and

the 5th passages. The gene expression of Nanog and Oct-4 was slightly downregulated, even though Dif-WJC maintained the multipotent potential in the 5th passage. In spite of the exogenous endothelial differentiation stimulus, these cells did not modulate neither CD31, CD34 nor vWF expression and they did not secrete 6-keto-prostaglandin-F_{1α}.

After observing the behavior of these cell lineages under culture conditions, we selected the 1st passage as the most suitable to be used in an experimental model of arterial replacement. The design and handling of the different vascular constructs was carried out by seeding the three cell types (HUVEC, WJC, Dif-WJC) onto the inner surface of tubular ePTFE vascular grafts precoated with a fibronectin solution. We cultured the grafts under static and dynamic conditions, and we could verify that the performance of the three types of grafts was very similar (with the only difference of the presence of a monolayer of HUVEC and a multilayer of both WJC and Dif-WJC): cells formed a layer that covered all the luminal surface after 24 h, this layer was stable at 48 h and showed evident signs of degeneration after 7 days. When the grafts were interposed into a pulsatile flow circuit for 1 h, about 70-80% of the graft surface was denudated, demonstrating the important influence of the shear stress on the stability of the seeded cell layer.

We developed the arterial replacement model using Beagle dogs, and grafting 4 cm segments of the different constructs in the common femoral artery, left or right, depending on each experimental group. Morphological and histological analyses after 60 days revealed that non-seeded ePTFE constructs (control group) showed the highest failure rate (75% occlusion), and a thicker intimal hyperplasia than the rest of the groups. Constructs seeded with HUVEC showed the lowest failure rate (25% occlusion) and an intimal hyperplasia significantly thinner than the control group. We could observe a gradual increase of the intimal hyperplasia thickness ranging from the proximal to the distal anastomosis. The performance of the ePTFE seeded with both WJC and Dif-WJC was better than the control group (55% and 50% occlusion,

respectively), but not as good as the HUVEC group. In spite of this, both experimental groups developed an intimal hyperplasia with a roughly homogeneous thickness between proximal and distal ends.

We could observe a similar colonization of the biomaterial in all of the experimental groups analysed, highlighting: moderate cell infiltration inside the ePTFE internodal zones (specially the luminal and adventitial areas); low macrophagic reaction (except in the perianastomotic regions, where the presence of active macrophages is increased); and the formation of a neoadventitial layer with fibroblastoid-like cells, microvasculature and high amounts of type I collagen.

From the results obtained, the following **conclusions** can be drawn:

- Under our experimental conditions, Wharton's jelly cells (WJC) display a phenotypical profile which shows characteristics of mesenchymal stem cells committed to the fibroblastic lineage.
- The protocol we designed to induce the endothelial differentiation has not been efficient enough, since the conditioned cell population (Dif-WJC) has kept its progression and maturation from the fibroblastic to the myofibroblastic lineage.
- The different populations analysed (HUVEC, WJC, Dif-WJC) show a similar behaviour, leading to the development of a stable cell layer onto the luminal surface of the ePTFE grafts.
- Thrombogenicity of the vascular constructs is reduced when a cellular layer is interposed as an interface between the blood and the biomaterial. The efficacy of this layer significantly increases in the case of endothelial cells, in comparison with Wharton's jelly cells, regardless of being these cells undifferentiated or conditioned.

- The healing response, measured as intimal hyperplasia or arterial restenosis, decreases with the cell seeding. Amongst the different groups analysed, the one seeded with differentiated Wharton's jelly cells (Dif-WJC) has displayed a significantly better performance, in terms of the formation of a more stable and appropriately developed neointimal layer that does not compromise the patency of the graft.

Because of these reasons, we are inclined to reject our first **Hypothesis**:

“Are umbilical cord Wharton's jelly cells a mesenchymal cell population with the ability to differentiate towards the endothelial lineage?”

Stating that, under our experimental conditions, Wharton's jelly cells constitute a mesenchymal-like population committed to the conjunctive lineage, and not sensitive to the endothelial differentiation medium.

On the contrary, we are able to raise our second **Hypothesis**:

“Can these cells improve the patency of small caliber ePTFE vascular grafts?”

To the category of **Thesis** and conclude that:

Differentiated mesenchymal cells from Wharton's jelly stimulate the development of a thinner and more stable neointimal layer than the other cell populations, which could cooperate in the reduction of the restenotic processes triggered inside the vascular graft.

Capítulo 1

Introducción

1.1 EL CORDÓN UMBILICAL

El cordón umbilical (en latín, *funiculus umbilicalis*) constituye una estructura extraembrionaria fundamental para el correcto desarrollo del feto. Es un tejido de aspecto tubular que conecta al feto con la placenta, órgano que actuará de barrera, permitiendo que el feto en desarrollo obtenga a través de la sangre materna todos los nutrientes necesarios para realizar correctamente las funciones vitales (respiración, nutrición y excreción) y completar así el periodo de gestación.

1.1.1 Origen embriológico del cordón umbilical

Durante el desarrollo embrionario, el cordón umbilical constituye el principal nexo entre el feto y la madre. En la especie humana, esta estructura comienza a formarse en la quinta semana de desarrollo, cuando un componente embrionario denominado anillo umbilical primitivo (línea de reflexión entre el amnios y el ectodermo embrionario) es atravesado por el pedículo de fijación (formado por mesodermo, la membrana alantoidea, una vena y dos arterias umbilicales), el pedículo vitelino junto a sus vasos, y el conducto de comunicación entre las cavidades celómicas intra y extraembrionaria (Williams y cols., 1985). Debido al crecimiento progresivo del embrión y del amnios, el saco vitelino y la membrana alantoidea se constriñen gradualmente, dando lugar a un cordón umbilical primitivo (Sadler, 2006) que irá madurando durante prácticamente todo el periodo gestacional.

Desde el momento de su formación hasta alcanzar la octava semana de desarrollo, el cordón umbilical presenta una estructura gruesa, con longitud y espesor similares, y el futuro ombligo se dispone alrededor del cordón umbilical, como si de una hernia se tratase (Forraz y McGuckin, 2011). A partir de este punto el cordón experimenta un crecimiento en longitud que continuará hasta la semana 36 de gestación, a pesar de que su estructura está prácticamente formada en la semana 28 (Kinare, 2008). Al finalizar el desarrollo embrionario, el cordón umbilical puede alcanzar longitudes medias de entre

55 y 65 cm (Baergen, 2005) presentando variaciones intraespecíficas que van desde 20 hasta 120 cm, y un diámetro medio de 1 a 2 cm (Kadam y cols., 2009).

1.1.2 Citoarquitectura del cordón umbilical

El cordón umbilical se comunica con el feto en desarrollo en uno de sus extremos y con la placenta en el otro. La superficie externa del cordón está tapizada por una capa de **tejido epitelial amniótico**, que conecta con el revestimiento placentario y la piel fetal. En la región umbilical, el epitelio es de tipo estratificado, escamoso, no queratinizado (Baergen, 2005). En la región más distal del cordón, el epitelio se modifica al tipo estratificado columnar, y a continuación simple columnar en la zona de revestimiento fetal. A lo largo del cordón el epitelio umbilical se engrosa, presentando regiones aisladas que están formadas por más de cinco capas de células epiteliales (Sanmano y cols., 2005).

Bajo el epitelio umbilical, el cordón presenta una capa de tejido conjuntivo derivado del mesoderma extraembrionario, que está formado principalmente por una sustancia mixomatosa denominada **gelatina de Wharton**. Este tejido fue descrito en el año 1656 por el médico, físico y científico británico Thomas Wharton (Wharton, 1656; Speert, 1956; Cook, 1998). Wharton no sólo dio nombre a esta estructura, sino que realizó una concisa descripción del tejido basándose en sus estudios y observaciones con fetos bovinos, especulando sobre el posible origen embriológico del mismo.

Los avances tecnológicos acaecidos en los siglos posteriores (sobre todo durante el siglo XX) han permitido estudiar la composición de la gelatina de Wharton a nivel molecular. En la actualidad sabemos que en este tejido abundan componentes de la matriz extracelular tales como proteoglicanos y glicosaminoglicanos -principalmente ácido hialurónico, condroitín sulfatos B (Danishefsky y Bella, 1966) y C (Meyer y Palmer, 1936), heparán sulfato (Nanaev y cols., 1997; Gogiel y cols., 2003) y en menor cantidad decorina, biglicano y versicano (Gogiel y cols., 2003; Valiyaveettil y col, 2004)-,

ácidos grasos insaturados libres (Romanowicz y cols., 2008), colesterol libre y ésteres de colesterol (Romanowicz y Bankowski, 2010). Todos estos componentes están embebidos en una matriz fibrilar de colágenos de tipo I, II, III, IV, V, VI (Nanaev y cols., 1997; Bankowski, 1999; Chan y cols., 2009) y VII (Ryynänen y cols., 1993; Chan y cols., 2009), fibrilina (Franc y cols., 1998) y laminina (Nanaev y cols., 1997). El colágeno presente en este tejido abarca aproximadamente el 50% de su peso seco, y está formado en su mayoría por colágeno de tipo I (Chan y cols., 2009), mientras que el ácido hialurónico constituye el glicosaminoglicano más abundante (Chan y cols., 2009). Juntas, estas estructuras aportan a la gelatina de Wharton unas propiedades de hidratación, viscoelasticidad y viscoporosidad características, permitiendo que el cordón tenga la combinación de flexibilidad y rigidez necesarias para resistir las fuerzas de extensión y compresión provocadas por los movimientos fetales y las contracciones uterinas (Kobayashi y cols., 1998; Malkowski y cols., 2007).

La gelatina de Wharton constituye además un tejido de reserva de numerosos factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) y básico (bFGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β) (Sobolewski y cols., 2005; Malkowski y cols., 2007).

Inmersas en el tejido y en una proporción más baja que los componentes de la matriz extracelular se localizan unas células elongadas que presentan una distribución concéntrica a lo largo de todo el cordón (Parry, 1970; McElreavey y cols., 1991), y se conocen como las **células de la gelatina de Wharton**. Junto a estas células y en número significativamente menor se encuentran algunos mastocitos aislados y dispersos por el tejido (Parry, 1970).

Por último, embebidos en la gelatina de Wharton se localizan los **vasos umbilicales**, de longitud y número variable dependiendo de la especie animal (Miglino

y DiDio, 1992). En el caso de los humanos, el número de vasos umbilicales se reduce a una vena y dos arterias, y conectan la vasculatura placentaria con la fetal. La gelatina de Wharton envuelve y protege a los vasos umbilicales, evitando que se produzcan compresiones, torsiones o plegamientos en los mismos (Takechi y cols., 1993), permitiendo así el flujo bidireccional de sangre materno-fetal con el consecuente intercambio de sustancias nutritivas y desechos entre ambos.

Las arterias umbilicales se comunican con el feto al nivel de las arterias ilíacas, y transportan la sangre desoxigenada y los desechos fetales hasta la placenta, órgano que difundirá estos desechos al sistema circulatorio materno para su posterior depuración. La vena umbilical, a su vez, se origina en la placenta, atraviesa el cordón en su longitud y comunica con la vena cava inferior del feto mediante el ducto venoso, aportándole sangre rica en oxígeno y nutrientes provenientes del sistema circulatorio materno.

El cordón umbilical no tiene *vasa varorum*, inervación ni irrigación linfática, por lo que los vasos umbilicales son las únicas estructuras presentes en su interior. Estos vasos muestran notables diferencias estructurales en comparación con los vasos sanguíneos de similar calibre que posee un individuo adulto (Baergen, 2005):

1. En primer lugar, las células endoteliales de la capa íntima de los vasos umbilicales presentan un extraordinario número de orgánulos en comparación con el endotelio de individuos adultos. Estas células presentan también interdigitaciones con las células adyacentes de la capa media, formando un sistema endotelio-muscular característico de los vasos umbilicales.
2. La capa media de los vasos umbilicales tiene una disposición diferente a la presente en los vasos sanguíneos adultos. En las arterias umbilicales, las fibras musculares están dispuestas en espiral. En la vena, esta capa es delgada y está formada por láminas individualizadas de fibras musculares longitudinales o

circulares. Además, La vena umbilical presenta una lámina elástica interna que no aparece en las arterias umbilicales.

3. Finalmente, los vasos umbilicales no poseen una capa adventicial verdadera, sino que presentan paquetes de fibras de colágeno espiralizado que originan una pseudoadventicia.

1.2 EL CORDÓN UMBILICAL COMO TEJIDO FUENTE PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS

La terapia celular es una de las estrategias terapéuticas más relevantes dentro del área de la medicina regenerativa y reparativa (Mason y cols., 2011), basándose en el uso de células -de origen humano o animal- con el fin de reparar o reemplazar los tejidos dañados. Dependiendo de la aplicación final, la terapia celular puede llevarse a cabo mediante el uso de células diferenciadas y/o indiferenciadas. Estas últimas tienen unas características particulares de autorrenovación y diferenciación, y se denominan células madre o células troncales, aunque también se conocen con su denominación en inglés, *stem cells*. El uso de estas células es cada vez más demandado, debido a que las células madre, dadas sus características, pueden llevar a cabo procesos reparativos más profundos que las células diferenciadas (Mason y Dunnill., 2008).

Las células madre son capaces de autorrenovarse durante numerosas generaciones, permitiendo mantener constante el número de células indiferenciadas en la población. También tienen la capacidad de diferenciarse hacia múltiples líneas celulares, dando lugar a células hijas que gradualmente irán adquiriendo cualidades propias de las células especializadas presentes en el tejido (Anderson y cols., 2001).

La capacidad de diferenciación es uno de los rasgos más importantes que define a las células madre, y ha permitido establecer un orden jerárquico de estas células

dependiendo del potencial de diferenciación que presentan (Lovell-Badge, 2001; Fortier, 2005): en el punto más alto de esta jerarquía se encuentran las células madre **totipotentes**, que tienen la capacidad de diferenciarse hacia cualquier estirpe celular, ya sea embrionaria o extraembrionaria. Las células totipotentes tienen por tanto la capacidad de formar un individuo completo, incluidos los tejidos extraembrionarios. En el caso de mamíferos, solamente se pueden considerar como totipotentes el cigoto y los blastómeros de las cuatro primeras divisiones mitóticas. Tras la quinta división, el potencial de diferenciación de los blastómeros disminuye y las células pasan a ser **pluripotentes**. Estas células pueden dar lugar a cualquier estirpe celular del endodermo, mesodermo o ectodermo embrionario, pero no son capaces de originar células de los tejidos extraembrionarios. En los tejidos fetales y adultos se localizan células **multipotentes** que son capaces de diferenciarse en diversos tipos celulares procedentes de tan sólo una capa embrionaria: endodermo, mesodermo o ectodermo. A partir de éstas surgen las células **unipotentes** o células precursoras, que tienen la capacidad de generar únicamente un tipo celular (Sell, 2004; Jaenisch y Young, 2008).

En un desarrollo embrionario normal, las células modifican su capacidad de diferenciación de forma gradual y unidireccional; estas transformaciones son posibles gracias a las interacciones entre las células y a la existencia de una serie de modificaciones epigenéticas que regulan estos procesos (Gan y cols., 2007; Surani y cols., 2007).

El potencial de diferenciación de las células madre permite su utilización en diversidad de aplicaciones, siendo la regeneración de tejidos dañados una de las más estudiadas (Prósper y cols., 2006) aunque también se podrían emplear como vehículo terapéutico de genes, en terapias antitumorales, antiangiogénicas, etc. Uno de los tipos celulares más conocidos y valorados en el campo de la Ingeniería Tisular lo constituyen las denominadas **células mesenquimales**. Las células mesenquimales son células madre con potencial de diferenciación pluri o multipotente dependiendo de su origen,

que se localizan en prácticamente todos los tejidos del organismo adulto (Phinney y Prockop, 2007).

En la actualidad, la principal fuente de obtención de células mesenquimales, con fines tanto experimentales como clínicos, lo constituye la médula ósea de individuos postnatales y adultos. Las células mesenquimales de la médula ósea fueron descritas por primera vez por Friedenstein y su equipo en 1974 (Friedenstein y cols., 1974; Deans y Moseley, 2000). A partir de este tejido se pueden aislar poblaciones de células multipotentes que poseen la capacidad de diferenciarse hacia diversas estirpes como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, mioblastos, cardiomiocitos y hepatocitos (Bobis y cols., 2006), entre otras.

Sin embargo, las células mesenquimales obtenidas a partir de la médula ósea adulta poseen una serie de limitaciones que dificultan su uso terapéutico por diversos motivos: su obtención requiere del uso de técnicas altamente invasivas que suponen un considerable riesgo de morbilidad para el donante; el número de células que se puede aislar a partir de cada aspirado medular es muy limitado (Baksh y cols., 2007) debido a que el porcentaje de células mesenquimales presentes en la médula ósea es muy bajo, oscilando entre el 0,001 y el 0,01% (Mihu y cols., 2008); las células, una vez aisladas, las células alcanzan la senescencia en cultivo a las pocas semanas de su obtención (Weiss y Troyer, 2006); y por último, tanto el número de células viables como su potencial de diferenciación disminuyen a medida que el individuo envejece (Bacigalupo, 2004) reduciendo aún más las posibilidades de obtener un número adecuado de células.

Teniendo en cuenta que las células mesenquimales están presentes en prácticamente todos los tejidos, la comunidad científica ha invertido recursos durante años con el fin de encontrar una fuente alternativa al uso de la médula ósea. Son múltiples los trabajos publicados en los que se demuestra que es posible aislar células mesenquimales a partir de tejidos adultos tales como cerebro, médula espinal, grasa, pulpa dentaria, vasos sanguíneos, músculo esquelético, piel, tejido conjuntivo, córnea,

retina, hígado, conductos pancreáticos, folículos pilosos, tejido gastrointestinal y pulmón (Weismann y cols., 2001; Verfaillie y cols., 2002; Prósper y Verfaillie, 2003; Hernández-Ramírez y Dorticós, 2004). Además de los tejidos adultos, se ha comprobado la existencia de células mesenquimales en tejidos extraembrionarios como la placenta (Miao y cols., 2006), el cordón umbilical (Troyer y Weiss, 2008; Kestendjieva y cols., 2008) y la sangre del cordón umbilical (Erices y cols., 2000). De entre todos éstos, el cordón umbilical destaca por ser un tejido que no requiere de técnicas quirúrgicas invasivas para su obtención. Al igual que la placenta, el cordón es un tejido fetal extraembrionario que constituye un estado de transición entre el tejido embrionario y el adulto (Mitchell, 2005; Taghizadeh y cols., 2011), lo que reduce sensiblemente la problemática ética que acompaña el uso de este tipo de tejidos.

Los tejidos extraembrionarios se descartan de forma rutinaria, tratándose como residuo biológico tras el parto o cesárea. Se ha demostrado que a partir de un único cordón umbilical es posible obtener un número de células mesenquimales significativamente mayor que partiendo de un aspirado medular (Baksh y cols., 2007; Chen MY y cols., 2009). Teniendo en cuenta que es posible obtener un número ilimitado de cordones umbilicales y que su manipulación con fines tanto científicos como clínicos no supone grandes problemas éticos, el cordón umbilical podría suponer una fuente inagotable de recursos alternativos al uso de células madre procedentes de otros tejidos.

Las células mesenquimales de cordón umbilical y su posible potencial terapéutico han sido objeto de estudio durante las últimas décadas, especialmente a lo largo de los últimos años. Numerosos autores han demostrado que es posible obtener células mesenquimales a partir de diferentes regiones del cordón umbilical:

1. Células de la gelatina de Wharton: La mayoría de los trabajos publicados desde el año 1991 se han llevado a cabo utilizando células mesenquimales aisladas de la totalidad del tejido (McElreavey y cols., 1991; Mitchell y cols., 2003; Fu y cols.,

2004; Medicetty y cols., 2004; Wang HS y cols., 2004; Ma y cols., 2005; Conconi y cols., 2006; Fu y cols., 2006; Lu y cols., 2006; Weiss y cols., 2006; Schmidt D y cols., 2006; Weiss y Troyer, 2006; Bailey y cols., 2007; Fong y cols., 2007; Friedman y cols., 2007; Hoynowski y cols., 2007; Jomura y cols., 2007; Karahuseyinoglu y cols., 2007; Lund y cols., 2007; Wu KH y cols., 2007; Bakhshi y cols., 2008; Chao y cols., 2008; Karahuseyinoglu y cols., 2008; Qiao y cols., 2008; Seshareddy y cols., 2008; Weiss y cols., 2008; Ayuzawa y cols., 2009; Chen MY y cols., 2009; Ciavarella y cols., 2009; Diao y cols., 2008; Ganta y cols., 2009; Girdlestone y cols., 2009; Hou y cols., 2009; Ishige y cols., 2009; Ji y cols., 2009; Kadam y cols., 2009; La Rocca y cols., 2009b; Majore y cols., 2009; Petsa y cols., 2009; Wang SH y cols., 2009; Alaminos y cols., 2010; Angelucci y cols., 2010; Cho M y cols., 2010; Cutler y cols., 2010; Fong y cols., 2010; Huang P y cols., 2010; Kocaeffe y cols., 2010; Lavrentieva y cols., 2010; Najjar y cols., 2010a; Nekanti y cols., 2010a-c; Prasanna y cols., 2010; Schneider y cols., 2010a-b; Wang D y cols., 2010; Wang L y cols., 2010; Xu HH y cols., 2010; Fong y cols., 2011; Lupu y cols., 2011; Peng y cols., 2011; Wang HW y cols., 2011; Yang y cols., 2011; Baba y cols., 2012; Balasubramanian y cols., 2012; Fong y cols., 2012; Garzón y cols., 2012; Mathieu y cols., 2012). Algunos autores sostienen sin embargo que la gelatina de Wharton se puede dividir en tres regiones anatómicas independientes: subamniótica, intervascular y perivascular (Nanaev y cols., 1997; Can y Karahuseyinoglu; 2007; Karahuseyinoglu y cols., 2007; Troyer y Weiss, 2008), aunque no existen datos suficientes para confirmar si las células de cada una de estas regiones son las mismas o constituyen poblaciones celulares diferentes (Troyer y Weiss, 2008). Partiendo de este concepto, en los últimos años varios grupos han logrado obtener células específicamente de la gelatina subamniótica (Kita y cols., 2010; Jeschke y cols., 2011), intervascular (Corradetti y cols., 2011) y perivascular (Sarugaser y cols., 2005; Baksh y cols., 2007; Ennis y cols., 2008a-b; Passeri y cols., 2009; Wu LF y cols., 2009; Corradetti y cols., 2011; Farias y cols., 2011; Gómez-Millán y cols., 2012).

2. Células del subendotelio venoso: En la región subendotelial de la vena umbilical existen unas células muy similares a las de la gelatina de Wharton (Covas y cols., 2003; Romanov y cols., 2003; Kim JW y cols., 2004; Panepucci y cols., 2004; Yarygin y cols., 2006; Kermani y cols., 2008; Kestendjieva y cols., 2008; Secco y cols., 2008; Ishige y cols., 2009; Zucconi y cols., 2010; Zucconi y cols., 2011). Se ha comprobado que las células del subendotelio venoso no pertenecen a la túnica media de la vena, ya que estas células carecen de miosina de músculo liso en su citoplasma (Romanov y cols., 2003), proteína altamente expresada en las células musculares lisas de la túnica media. Además, al igual que las de la gelatina de Wharton, las células del subendotelio venoso presentan características inmunofenotípicas y patrones de autorrenovación, proliferación y diferenciación propios de las células mesenquimales (Ishige y cols., 2009).

3. Células de la sangre umbilical: En los últimos años, diversos grupos de investigación han podido comprobar que la sangre presente en la vena umbilical contiene de células que muestran propiedades de proliferación y diferenciación muy similares a las de las células mesenquimales de la médula ósea (Erices y cols., 2000; Goodwin y cols., 2001; Rosada y cols., 2003; Bieback y cols., 2004; Lee y cols., 2004; Jeong y cols., 2005; Gang y cols., 2006; Kim JY y cols., 2010). Si bien este hallazgo podría suponer la mejor alternativa al uso de las células de la médula ósea, la presencia de estas células en la sangre umbilical es en la actualidad un hecho muy controvertido (Mareschi y cols., 2001; Romanov y cols., 2003; Wexler y cols., 2003; Secco y cols., 2008; Zeddou y cols., 2010) y no se ha alcanzado aún un acuerdo sobre su posible eficacia en aplicaciones clínicas. Los resultados publicados por Musina en 2007 son un ejemplo de esta controversia (Musina y cols., 2007), al demostrar que el número de células mesenquimales presentes en la sangre no sólo es extremadamente bajo, sino que la tasa de proliferación de estas células es mucho menor en comparación con otras estirpes mesenquimales presentes en tejidos adultos.

Las poblaciones celulares aisladas de estas regiones presentan características inmunofenotípicas semejantes a las células mesenquimales de la médula ósea, pero con la particularidad de tener una mejor tasa de duplicación y mayor potencial de diferenciación (Fan y cols., 2011). Dado el interés suscitado por las células mesenquimales de cordón umbilical, en el presente Trabajo hemos seleccionado la gelatina de Wharton como tejido fuente para la obtención de poblaciones celulares indiferenciadas, describiendo a continuación sus características más relevantes, así como su potencial terapéutico y posibles aplicaciones clínicas.

1.3 CÉLULAS DE LA GELATINA DE WHARTON

En el cordón umbilical, la población de células de la gelatina de Wharton (en adelante, WJC) se encuentra dispersa por el tejido en una proporción muy baja con respecto a los componentes de la matriz extracelular. Estas células aparecen generalmente aisladas, y presentan una disposición determinada alrededor de los vasos umbilicales.

Las primeras observaciones de la gelatina de Wharton y sus componentes llevadas a cabo mediante técnicas de microscopía óptica se publicaron en el año 1954 (Chacko y Reynolds, 1954). Desde ese momento, este tejido ha sido estudiado en profundidad por numerosos grupos de investigación en todo el mundo.

En el año 1970, Parry realizó un exhaustivo análisis del cordón umbilical utilizando técnicas de microscopía electrónica (Parry, 1970) y observó que la morfología de las WJC era diferente dependiendo de si el tejido umbilical estaba dilatado o colapsado. Las células localizadas en las regiones dilatadas del cordón presentaban un aspecto elongado y una orientación concéntrica evidente, mientras que en las regiones más colapsadas las células presentaban un aspecto más estrellado y una distribución menos acusada. A nivel ultraestructural, las células de las regiones dilatadas poseían un

núcleo ovalado en posición central con nucleolos no muy prominentes, y los orgánulos se encontraban relativamente desplazados hacia los polos, predominando retículo endoplasmático rugoso con cisternas dilatadas, mitocondrias de pequeño tamaño y escaso aparato de Golgi. Sin embargo, las células de las regiones colapsadas del tejido presentaban un núcleo irregular con nucleolos más prominentes, así como un mayor número de cisternas del retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias más grandes y aparato de Golgi más abundante. Parry observó también diferencias en el tamaño y número de filamentos que conforman el citoesqueleto de estas células: las WJC elongadas mostraban mayor número y tamaño de filamentos dispuestos paralelamente al eje longitudinal de las células que recorrían toda la célula de polo a polo, atravesando la región perinuclear. Las WJC estrelladas mostraban un menor número y espesor de filamentos que no tenían una organización concreta. Basándose en la ultraestructura de las células concluyeron que las WJC son **miofibroblastos** (fibroblastos modificados que poseen características morfológicas similares a las células musculares lisas).

Años después, en 1993, Takechi y sus colaboradores corroboraron los estudios de microscopía electrónica utilizando técnicas inmunohistoquímicas (Takechi y cols., 1993); al igual que Parry, observaron que las WJC presentaban dos morfologías claramente diferenciadas: algunas células eran de aspecto fusiforme o elongado, mientras que otras eran de tipo estrellado, aunque en todos los casos las células presentaban un eje longitudinal de mayor longitud que el transversal. Observaron células con citoplasma acidófilo, núcleo ovalado con nucleolos prominentes, citoplasma rico en orgánulos (predominando retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y aparato de Golgi), vesículas pinocíticas bajo la membrana celular y filamentos organizados paralelos al eje longitudinal de la célula. Además, la superficie celular estaba en parte cubierta por fragmentos de membrana basal. Las técnicas inmunohistoquímicas revelaron que las WJC eran positivas para actina, miosina, vimentina, desmina y negativas para miosina de músculo liso. Tras sus observaciones, coincidieron con Parry en que las WJC son de tipo miofibroblastoide, y además sugirieron la posibilidad de que, dadas sus características, estas células podrían

intervenir en procesos de fibrinogénesis y contracción celular, pudiendo participar así en la regulación del flujo sanguíneo.

En 1997, Nanaev y su grupo completaron los estudios de microscopía electrónica e inmunohistoquímica (Nanaev y cols., 1997). Analizaron de forma independiente las regiones subamniótica, gelatina intervascular y adventicial (gelatina perivascular), centrandó su atención en la arquitectura de la matriz extracelular. Observaron que las proporciones de colágenos de tipo I, III y VI, laminina y heparán sulfato variaban entre estas regiones, siendo la gelatina intervascular la zona más homogénea en cuanto a su composición. Las células embebidas en la matriz extracelular eran positivas para vimentina, desmina, α -actina y γ -actina de músculo liso. Además, las células de la gelatina intervascular eran positivas para miosina de músculo liso. Concluyeron que las WJC de las regiones subamniótica, gelatina intervascular y adventicial constituyen poblaciones celulares con distintos estadios de maduración, siendo las células más cercanas al epitelio umbilical fibroblastos inmaduros y las células de la región adventicial miofibroblastos, quedando entonces las WJC intervasculares como un estadio intermedio entre fibroblasto y miofibroblasto.

Un año después, el grupo de Kobayashi realizó un estudio enfocado en la evolución de las WJC durante el periodo gestacional (Kobayashi y cols., 1998). Dividieron las muestras de cordón umbilical por trimestres (primer, segundo y tercer trimestre de gestación) y observaron que las WJC sufrían modificaciones morfológicas en cada trimestre, adquiriendo progresivamente propiedades específicas de miofibroblastos según avanzaba la gestación. Comprobaron que al inicio del segundo trimestre la gelatina presentaba haces de microfilamentos y las WJC comenzaban a expresar α -actina de músculo liso, sugiriendo la posibilidad de que las células tengan propiedades contráctiles que aportarían elasticidad a la gelatina, permitiendo la protección de los vasos sanguíneos de los movimientos compresivos generados por el feto y el propio útero.

Ese mismo año, Franc y sus colaboradores avanzaron un paso más en estudio de este tejido al incorporar técnicas de inmunoblot (Western blot) para analizar la composición de la matriz extracelular de la gelatina de Wharton (Franc y cols., 1998). Observaron que en la matriz predominaban los colágenos de tipo I, III y IV. Además, comprobaron que la gelatina era rica en haces de fibrillas estriadas rodeadas de una red de microfibrillas, concluyendo que la arquitectura de la matriz extracelular estaría implicada en la elasticidad del tejido.

Gracias a estos trabajos, la gelatina de Wharton es hoy en día un tejido muy bien caracterizado. A pesar de ello, aún hoy existen controversias a la hora de clasificar las WJC, ya sea en relación a su localización anatómica o a su potencial.

En dos de las revisiones bibliográficas más importantes publicadas hasta la fecha, los autores sostienen que la gelatina de Wharton se puede dividir en tres regiones no muy bien delimitadas (Can y Karahuseyinoglu, 2007; Troyer y Weiss, 2008). De este modo, se puede hablar de gelatina subamniótica, gelatina intervascular y gelatina perivascular [figura 1].

Se ha postulado que las WJC no tienen una distribución uniforme en cada una de estas regiones (Karahuseyinoglu y cols., 2007), sino que existen diferencias en el número, fenotipo y grado de maduración de las células en función de la región de la gelatina en que se encuentran (Nanaev y cols., 1997; Sarugaser y cols., 2005; Can y Karahuseyinoglu, 2007; Friedman y cols., 2007; Kita y cols., 2010; Corradetti y cols., 2011) [figura 2]. De este modo, las regiones subamniótica e intervascular de la gelatina de Wharton poseen un mayor número de WJC con un grado de indiferenciación más elevado que las presentes en la gelatina perivascular (Majore y cols., 2011). Debido a esto, las WJC subamnióticas e intervasculares serían las células con mayor potencial proliferativo.

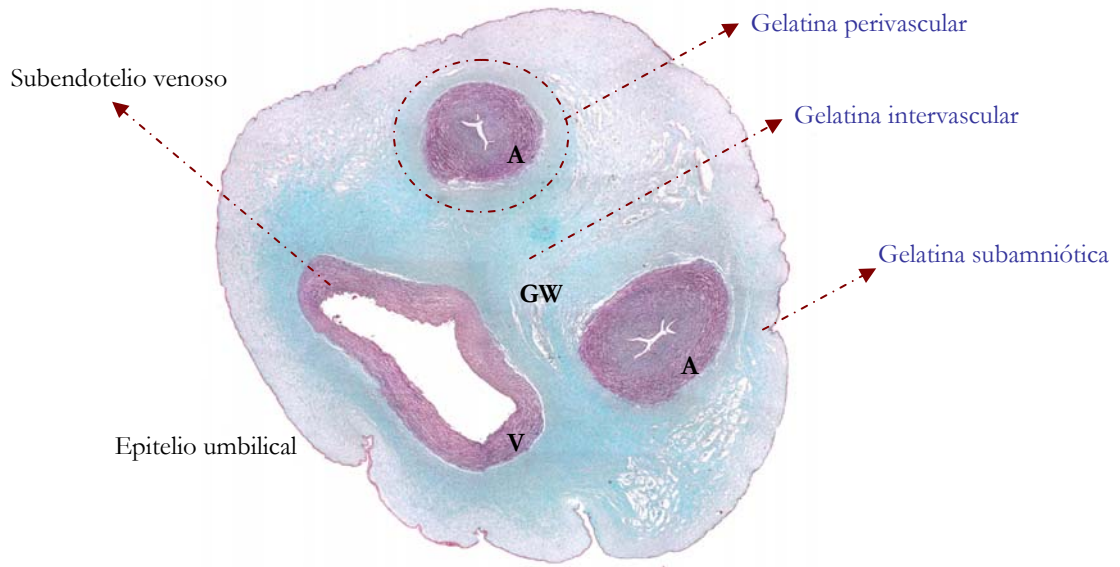


Figura 1: Imagen panorámica de la sección transversal de un cordón umbilical teñido con tricrómico de Masson (imágenes originales tomadas a 50 aumentos). Se pueden identificar las diferentes regiones de la gelatina de Wharton, así como los vasos umbilicales y el epitelio umbilical. A = Arteria umbilical; GW = Gelatina de Wharton; V = Vena umbilical. [Modificado de Troyer y Weiss., 2008].

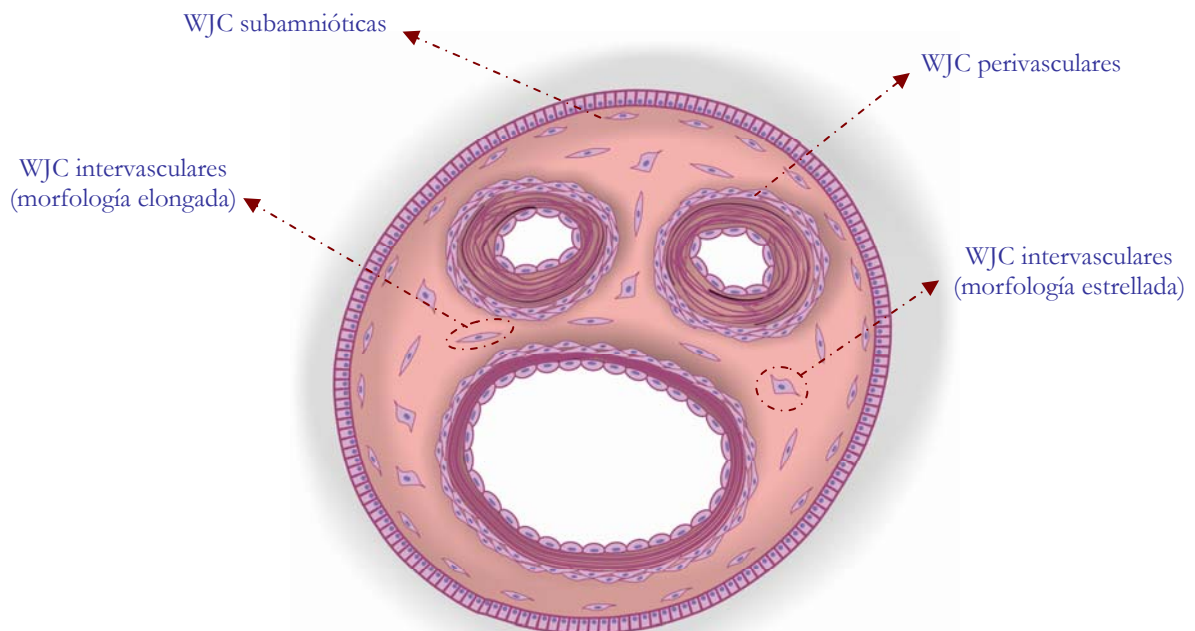


Figura 2: Esquema ilustrativo de la disposición de las WJC en las distintas regiones del cordón umbilical [Modificado de Kita y cols., 2010].

1.3.1 Aislamiento y expansión en cultivo de WJC

Las WJC se aislaron del tejido y expandieron en cultivo por primera vez en el año 1991 (McElreavey y cols., 1991) utilizando el denominado “método del explanto”. Esta técnica se diseñó a principios del siglo XX (Carrel y Burrows, 1911) y consiste en introducir pequeños explantos (fragmentos de tejido de aproximadamente 1-3 mm³) en el interior de un frasco de cultivo, y mantenerlos inmersos en el medio de cultivo bajo unas condiciones óptimas de humedad, temperatura y atmósfera de CO₂, permitiendo así que las células migren desde el explanto, atraviesen la matriz extracelular y se adhieran a la superficie del frasco de cultivo, comenzando su expansión *in vitro*.

Utilizando esta metodología, las WJC tardan aproximadamente dos semanas en migrar del explanto y colonizar el frasco de cultivo (Petsa y cols., 2009). Es un proceso relativamente lento, pero resulta muy eficaz a la hora de obtener poblaciones celulares cuyas propiedades no han sido modificadas por el uso de enzimas que degraden la matriz extracelular y alteren las funciones celulares, reduciendo su viabilidad (La Rocca y cols., 2009b; Xu Y y cols., 2010). Permite además obtener células con tiempos de duplicación de entre 12 y 24 h y una buena capacidad proliferativa (Xu Y y cols., 2010).

Sin embargo, debido a la gran cantidad de matriz extracelular presente en la gelatina, la obtención de WJC por explantos no siempre es viable. Por ese motivo es frecuente realizar una digestión enzimática previa al cultivo, permitiendo a las células una expansión con mayor facilidad y rapidez. Los cultivos de WJC obtenidos por digestión enzimática suelen tener una tasa del éxito cercana al 100% (Lu y cols., 2006); las células se han liberado de la matriz extracelular gracias a la digestión, con lo que colonizan el frasco de cultivo desde el primer día y pueden alcanzar el estado de confluencia a los pocos días de su aislamiento (Lu y cols., 2006; Bailey y cols., 2007).

El aislamiento de células por digestión enzimática se realiza a 37 °C, para que las enzimas implicadas actúen de manera óptima. Éstas actuarán degradando los enlaces

peptídicos de los componentes y proteínas de la matriz extracelular, permitiendo que las células migren rápidamente hacia la superficie del frasco de cultivo. Estos procesos pueden llevarse a cabo en un único paso (empleando para ello una única enzima o un cóctel enzimático) o mediante una doble digestión, en la que se utilizan dos enzimas de forma independiente.

Generalmente, cuando se trata de una digestión en un solo paso, se utiliza la enzima colagenasa de tipo I (en un rango de concentración entre 1 y 2 mg/mL) durante periodos de incubación que oscilan entre las 18 h y las 24 h (Sarugaser y cols., 2005; Baksh y cols., 2007). Los cócteles enzimáticos suelen combinar colagenasa, hialuronidasa y tripsina a distintas concentraciones, y permiten que la digestión se lleve a cabo en periodos de tiempo significativamente más cortos, entre 30 min y 1 h (Weiss y cols., 2006; Bailey y cols., 2007; Ayuzawa y cols., 2009). La doble digestión enzimática se suele llevar a cabo utilizando en primer lugar colagenasa de tipo I durante periodos de incubación que oscilan entre las 4 h (Alaminos y cols., 2010) y las 24 h (Wang SH y cols., 2009). El proceso continúa con una segunda digestión en la que se emplea tripsina-EDTA a una concentración v/v del 2,5 % durante periodos de tiempo no superiores a 30 min, dada la agresividad de esta peptidasa (Wang HS y cols., 2004; Fu y cols., 2004; Chao y cols., 2008; Alaminos y cols., 2010).

La gran mayoría de las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha han utilizado cordones umbilicales humanos como tejido fuente para la obtención de WJC. Sin embargo, son varios los grupos que trabajan con células de origen porcino (Mitchell y cols., 2003; Weiss y cols., 2003; Medicetti y cols., 2004; Cho PS y cols., 2008), equino (Hoynowski y cols., 2007; Passeri y cols., 2009; Corradetti y cols., 2011), canino (Filioli-Uranio y cols., 2011) o murino (Jomura y cols., 2007; Ganta y cols., 2009). Uno de los medios de cultivo que más se ha empleado para la expansión *in vitro* de estas células es el llamado “medio de Eagle modificado por Dulbecco” (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) en cantidades que oscilan entre el 2 % (Weiss y cols., 2006) y el 20 % (Passeri y cols., 2009).

1.3.2 Caracterización de WJC

En el año 2005, La *Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)* estableció una serie de criterios mínimos que han de cumplir las células mesenquimales en cultivo para poder ser consideradas como tal (Horwitz y cols., 2005; Dominici y cols., 2006). Estos criterios se aplican exclusivamente a células de origen humano, y son los siguientes:

1. Las células han de ser adherentes sobre superficies plásticas cuando son puestas en cultivo bajo condiciones estándar.
2. Las células han de presentar un inmunofenotipo en el que, como mínimo, se observe un claro marcaje de ciertas proteínas CD- (cúmulo de diferenciación):
 - Positivo ($\geq 95\%$): CD73, CD90, CD105.
 - Negativo ($\leq 2\%$): CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD19 o CD79 α , HLA-DR.
3. Las células han de tener una evidente capacidad de diferenciación *in vitro* hacia las líneas osteogénica, condrogénica y adipogénica.

Para poder determinar si las WJC son en realidad un tipo de célula mesenquimal, se han llevado a cabo varios estudios comparativos con células mesenquimales procedentes de aspirados medulares (Baksh y cols., 2007; Chen MY y cols., 2009; Wu LF y cols., 2009; Najjar y cols., 2010a; Prasanna y cols., 2010; Schneider y cols., 2010a; Balasubramanian y cols., 2012). En ellos se ha podido comprobar que ambas estirpes muestran un inmunofenotipo no hematopoyético y una morfología de tipo fibroblastoide. Curiosamente, las WJC presentan tiempos de duplicación más rápidos y una tasa de duplicación más elevada que las células mesenquimales de médula ósea. Según estos autores, las WJC tienen mayor expresión de una serie de quimiocinas -de tipo CXC y con ligando (CXCL)- relacionadas con actividades angiogénicas (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 y CXCL8) y secretan al medio cantidades ligeramente más elevadas de varios factores de crecimiento: factor de crecimiento endotelial vascular D

(VEGF-D), fibroblástico (bFGF), de hepatocitos (HGF), derivados de plaquetas (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-RB) y transformantes (TGF- α , TGF- β) (Malkowski y cols., 2008). Finalmente, ambas estirpes celulares tienen capacidad de diferenciación *in vitro* hacia las líneas osteogénica, condrogénica y adipogénica.

Paralelamente a estos estudios, se han realizado diversos experimentos *in vitro* en los que se ha demostrado que las WJC en cultivo poseen propiedades inmunosupresoras, inmunomoduladoras e inmunoprivilegiadas similares a las de las células mesenquimales de médula ósea (Ennis y cols., 2008a; Weiss y cols., 2008; Yoo KH y cols., 2009). Otros investigadores han complementado los análisis *in vitro* con estudios *in vivo*; entre éstos destacan Cho y colaboradores (Cho PS y cols., 2008), que fueron los primeros en demostrar la inmunogenicidad de las WJC porcinas mediante un modelo de trasplante alogénico. La capacidad inmunosupresora de WJC ha sido recientemente demostrada tras comprobar que las WJC reducen el riesgo de rechazo en ratones a los que previamente se les han trasplantado esplenocitos y células de médula ósea (Capelli y cols., 2011). Otro experimento destacado lo llevaron a cabo Conconi y colaboradores (Conconi y cols., 2006), que demostraron que las WJC humanas no son tumorigénicas tras ser xenotrasplantadas en un modelo murino de defecto muscular.

El inmunofenotipo de las WJC está ampliamente estudiado mediante técnicas de citometría de flujo, y, en líneas generales, los resultados obtenidos por los distintos grupos son consistentes. Anzalone y colaboradores han publicado recientemente una revisión (Anzalone y cols., 2010) en la que resumen de forma comparativa el inmunofenotipo observado en WJC y en células mesenquimales de médula ósea. En este trabajo se puede comprobar que ambas estirpes muestran expresión positiva para una serie de citoquinas (CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD51, CD73, CD90, CD105, CD166), citoqueratinas (CK-18, CK-19), factores de transcripción (Nanog, Oct3/4, GATA-4), marcadores de la línea neural (nestina, NSE), y proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G),

del citoesqueleto (GFAP, α -actina, vimentina) y de unión tipo GAP (conexina-43). De igual forma, ambos tipos celulares son negativos para marcadores de líneas hematopoyética y endotelial (CD14, CD31, CD33, CD34, CD45, CD86) y proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR).

En otros trabajos no incluidos en la revisión de Anzalone se puede encontrar más información acerca del inmunofenotipo de estas células: las WJC tienen expresión positiva para CD68 (La Rocca y cols., 2009a), CD80 (Deans y Moseley, 2000; La Rocca y cols., 2009b), CD117 (Deans y Moseley, 2000; Mitchell y cols., 2003), CD146 (Baksh y cols., 2007); CK-8 (Deans y Moseley, 2000; Sarugaser y cols., 2005), GATA-5, GATA-6 y HNF-4 α (La Rocca y cols., 2009b), y negativa para CD56 (Wang HS y cols., 2004; Weiss y cols., 2006; Battula y cols., 2009), CD163 (La Rocca y cols., 2009a), CK-7 (La Rocca y cols., 2009b).

En cuanto a su capacidad proliferativa, las WJC presentan tiempos de duplicación de aproximadamente 12 a 25 h durante los primeros subcultivos (Baksh y cols., 2007; Karahuseyinoglu y cols., 2007). Estas células pueden llevar a cabo un número de duplicaciones que oscila entre 20 y 80 sin mostrar signos de senescencia ni aberraciones en su cariotipo (Mitchell y cols., 2003; Conconi y cols., 2006; Weiss y cols., 2006; Can y Karahuseyinoglu, 2007; La Rocca y cols., 2009b).

La pérdida de la capacidad proliferativa suele estar relacionada con el acortamiento tras cada división mitótica de los extremos cromosómicos, denominados telómeros. En células humanas, los telómeros están formados por una serie de repeticiones del tipo TTAGGG y proteínas asociadas (Collins, 2000). Su función consiste en proteger los extremos cromosómicos de los posibles procesos de fusión, recombinación y degradación que puedan llevarse a cabo durante la mitosis (Zimmermann y cols., 2003). Los telómeros se mantienen estables gracias a la telomerasa, enzima que actúa en cada división celular, utilizando su RNA intrínseco

como molde para sintetizar DNA y añadir nuevas repeticiones teloméricas al extremo cromosómico (Morin, 1989). Varios autores han demostrado que las WJC presentan actividad telomerasa (Mitchell y cols., 2003; Mitchell y cols., 2005; Karahuseyinoglu y cols., 2007; Lund y cols., 2007; Jo y cols., 2008; Kestendjieva y cols., 2008; Weiss y cols., 2008; Pappa, 2009; Filioli-Uranio y cols., 2011), lo que permite a estas células mantener un estado proliferativo en cultivo.

Bajo condiciones *in vitro*, las WJC presentan un ciclo celular en el que predomina el estado de quiescencia. En diversos experimentos realizados con células de origen humano y equino, aquéllas que están entre las fases G₀-G₁ del ciclo celular constituyen entre el 50% y el 90% del total de la población (Lu y cols., 2006; Hoynowski y cols., 2007; Majore y cols., 2009; Corradetti y cols., 2011; Majore y cols., 2011). Este porcentaje de quiescencia tan elevado puede considerarse como una característica estrechamente relacionada con la capacidad de autorrenovación de esta estirpe celular (Hoynowski y cols., 2007).

En resumen, y basándose en todas las observaciones publicadas durante los últimos años, son muchos los autores que afirman que las WJC constituyen una auténtica población de células mesenquimales que podrían suponer una alternativa viable al uso de células mesenquimales adultas en aplicaciones clínicas (Baksh y cols., 2007; Moretti y cols., 2010).

1.3.3 Potencial de diferenciación de WJC

Las WJC han sido sometidas a numerosos experimentos *in vitro* con el fin de demostrar su potencial de diferenciación. Dentro de la diferenciación hacia líneas mesodérmicas, está ampliamente descrito que las WJC son capaces de diferenciarse hacia osteocitos, condrocitos y adipocitos, hecho que ha sido recogido en varias revisiones bibliográficas (Can y Karahuseyinoglu, 2007; Troyer y Weiss, 2008; Moretti y cols., 2010; Fan y cols., 2011; Taghizadeh y cols., 2011; Witkowska-Zimny y cols.,

2011). La capacidad de diferenciación hacia otras estirpes mesodérmicas está menos documentada, aunque existen varios trabajos que confirman la diferenciación de WJC hacia cardiomiocitos (Wang HS y cols., 2004; Pereira y cols., 2008), miocitos esqueléticos (Conconi y cols., 2006) y células endoteliales (Wu KH y cols., 2007; Chen MY y cols., 2009; Wang SH y cols., 2009; Xu Y y cols., 2010). En el caso de las líneas de origen ectodérmico, algunos grupos han logrado dirigir las WJC hacia la estirpe neuronal (Mitchell y cols., 2003; Ma y cols., 2005; Fu YS y cols., 2006; Lu y cols., 2006; Karahuseyinoglu y cols., 2007). Por último, los trabajos que documentan la diferenciación de WJC hacia estirpes endodérmicas son muy escasos, siendo las más llamativas la diferenciación hacia hepatocitos inmaduros (Anzalone y cols., 2010) y hacia células β pancreáticas similares a las presentes en los islotes de Langerhans (Chao y cols., 2008; Wu LF y cols., 2009; Bhandari y cols., 2011; Wang HW y cols., 2011).

El potencial de diferenciación de WJC hacia la estirpe endotelial podría ser una herramienta clave que permita crear nuevos avances dentro del campo de la Ingeniería Tisular Vascular. Por este motivo, hemos seleccionado la capacidad de diferenciación endotelial como punto de partida para el desarrollo de los trabajos conducentes a la presente Memoria de Tesis Doctoral.

1.4 POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN ENDOTELIAL DE WJC

El interés por determinar la capacidad de las WJC para diferenciarse hacia la línea endotelial ha ido creciendo en los últimos años. Sin embargo, aunque los ensayos *in vitro* realizados hasta la fecha muestran resultados prometedores, aún estamos lejos de poder afirmar categóricamente que las WJC son capaces de realizar con total efectividad las funciones que las células endoteliales llevan a cabo en los vasos sanguíneos (Alaminos y cols., 2010).

La diferenciación de las células se lleva a cabo de forma general mediante el cultivo en un medio provisto de factores de crecimiento que estimulen a las células y las dirijan hacia la estirpe deseada. Los medios de cultivo empleados para la diferenciación endotelial de WJC varían en su composición entre los distintos grupos, y se resumen en la siguiente tabla [tabla 1].

Medio de diferenciación endotelial	Tiempo en cultivo	Autores
M199 + 2% FBS + 50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml bFGF.	2-3 días	(Wu KH y cols., 2007)
DMEM + 100 ng/mL VEGF + 50 ng/mL EGF + 1 ug/mL hidrocortisona + 5% FBS + 100 U/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina.	12 días	(Chen MY y cols., 2009)
EBM-2 + 20% FBS + hidrocortisona + VEGF + EGF + bFGF + IGF-1 + ácido ascórbico + heparina + gentamicina/anfotericina B. (Medio comercial, las concentraciones de los suplementos son desconocidas).	14-40 días	(Wang SH y cols., 2009)
M199 + 20% FBS + 2 mM/L L-glutamina + 20 µg/mL ECGS + 10.000 U/mL penicilina + 10.000 µg/mL estreptomina + 25 µg/mL anfotericina B.	4-7 días	(Alaminos y cols., 2010)
DMEM/F12 1:1 (v/v) + 2% FBS + 50 ng/mL VEGF + 2 ng/mL IGF-1 + 100 U/mL penicilina + 150 µg/mL gentamicina.	9 días	(Xu Y y cols., 2010)
IMDM+ 20% FBS + 40 ng/ml VEGF + 10 ng/ml bFGF + 10 ng/mlEGF + 20 ng/ml IGF-1 + 100 U/ml penicilina + 100 µg/ml estreptomina + 50 µg/ml neomicina.	3-4 semanas	(Lupu y cols., 2011)

Tabla 1: Medios de cultivo empleados para la diferenciación endotelial.

Una vez finalizado el periodo de tiempo en cultivo necesario en cada caso, las células se someten a una serie de experimentos con el fin de validar la efectividad de la diferenciación endotelial. Wu y colaboradores (Wu KH y cols., 2007) utilizaron su medio de diferenciación endotelial para cultivar WJC sobre matrigel, un soporte gelatinoso tridimensional muy empleado en ensayos de angiogénesis *in vitro*. Pasadas 48 h observaron que las células se organizaban en el matrigel siguiendo un patrón semejante al de una red vascular. Comprobaron también que un porcentaje de las WJC diferenciadas presentaban un fenotipo con expresión positiva para marcadores endoteliales como CD31, CD34. Estas células demostraron también capacidad para incorporar en su citoplasma la lipoproteína de baja densidad acetilada (ac-LDL), que se usa frecuentemente como marcador endotelial.

El análisis del RNA mensajero mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) que llevaron a cabo Chen y colaboradores (Chen MY y cols., 2009) demostró que, tras la inducción en cultivo, las WJC diferenciadas tienen expresión positiva para el receptor de tipo 2 del VEGF (VEGFR-2/KDR/Flk-1), factor de von Willebrand (vWF) y cadherina endotelial vascular (VE-cadherina). La expresión de los tres marcadores se corroboró al observar por inmunocitoquímica marcaje positivo en los cultivos de células diferenciadas. Estas células también fueron capaces de incorporar a su citoplasma ac-LDL y desarrollaron un patrón vascular en los experimentos con matrigel.

El medio de diferenciación endotelial empleado por el grupo de trabajo de Wang (Wang SH y cols., 2009) fue también efectivo: las WJC cultivadas bajo estas condiciones incorporaron ac-LDL y formaron estructuras tubulares sobre matrigel. Un porcentaje elevado de las células en cultivo mostraron expresión positiva para CD31, CD34, vWF, KDR y trombosmodulina tanto por inmunocitoquímica como por citometría de flujo y Western blot.

Los análisis por citometría de flujo de Xu y colaboradores (Xu Y y cols., 2010) revelaron que las WJC diferenciadas incorporaban ac-LDL a su citoplasma y que expresaban CD34, vWF y KDR, junto con otros marcadores con función endotelial como CD133 y VE-cadherina. Los porcentajes de expresión de todos estos marcadores incrementaron de forma gradual entre el día 9 y el 18 de la diferenciación endotelial.

Uno de los trabajos basados en experimentos *in vitro* más llamativos ha sido publicado recientemente (Lupu y cols., 2011). Las células diferenciadas se sembraron sobre secciones ventriculares de embriones de ratón, algunas de los cuales habían sido previamente sometidas a tratamiento con el fin de emular un infarto de miocardio. El inmunofenotipo que presentaron estas células correspondía al de una célula mesenquimal, pero con la particularidad de expresar además CD31. Al analizar las secciones ventriculares una vez finalizado el tiempo de estudio en cultivo (6 días para las secciones dañadas y 10 días para las secciones sanas), observaron una quimiotaxis muy intensa de las WJC hacia ambos tipos de secciones ventriculares, cubriéndolas por completo y rellenando cada cavidad o fisura que éstas tuvieran. Mediante análisis inmunohistoquímicos comprobaron que las células estaban muy integradas en las secciones, formando una lámina extensa y robusta a lo largo de toda la superficie. Afirmaron que las WJC, bajo unas condiciones de cultivo adecuadas, manifiestan propiedades tanto de célula mesenquimal como de célula endotelial.

La efectividad de estas células diferenciadas se ha valorado en algunas ocasiones mediante modelos experimentales *in vivo*, con el objetivo de comprobar la funcionalidad real de las WJC diferenciadas a endotelio. Uno de los modelos animales más empleados en este caso es un modelo murino de isquemia en extremidades inferiores, para lo que se utilizan ratones atímicos de la cepa BALB/c. Este tipo de isquemia se puede lograr mediante la ligadura y posterior sección de un conjunto de vasos sanguíneos -arterias femoral y safena, arteria y vena ilíacas circunflejas, y rama muscular- tal y como hicieron Wu y colaboradores (Wu KH y cols., 2007) y posteriormente el grupo de Xu (Xu Y y cols., 2010). Ambos grupos practicaron la isquemia únicamente en la extremidad

izquierda, dejando la derecha sana. Pasadas 24 h, llevaron a cabo un xenotrasplante de WJC humanas diferenciadas a célula endotelial mediante la inyección intramuscular de estas células (marcadas con un trazador fluorescente) en varias regiones distantes 1 mm de la zona de isquemia. El grupo de Xu añadió además un grupo control en el que se inyectaba medio de cultivo sin células.

Los animales se sacrificaron en distintos periodos de estudio comprendidos entre las 24 h y las 4 semanas. Gracias al trazador fluorescente, ambos grupos pudieron comprobar en primer lugar que las WJC migraron desde el lugar donde fueron inyectadas hasta la zona isquémica. Observaron también que las células se estaban integrando en la pared vascular y se comportaban como células endoteliales maduras al intervenir en la reendotelización de la zona dañada. Además, el grupo de Xu pudo comprobar que ninguno de los animales trasplantados sufría necrosis en las extremidades inferiores, hecho que sucedió en casi todos los individuos del grupo control. Ensayos por inmunohistoquímica revelaron que las células trasplantadas expresaban marcaje positivo para vWF, demostrando así que se habían diferenciado a células endoteliales funcionales.

Wang y colaboradores llevaron a cabo un xenotrasplante en un modelo murino de daño vascular por denudación arterial (Wang SH y cols., 2009). Para producir la lesión endotelial, dilataron la arteria femoral izquierda con ayuda de instrumental microquirúrgico, y mantuvieron la femoral derecha sana. A continuación inyectaron a través de la vena de la cola las distintas terapias celulares objeto de estudio, y se constituyó un grupo control en el que inyectaban suero salino. Los animales se sacrificaron escalonadamente en diferentes tiempos de estudio entre las 4 h y las 4 semanas, y el análisis de las diferentes muestras recogidas reveló que las WJC humanas diferenciadas a endotelio, no sólo eran capaces de migrar a la zona dañada y colaborar en la reendotelización de la arteria, sino que también intervenían en la reducción de la hiperplasia intimal generada como consecuencia del daño provocado en la pared arterial.

1.5 INGENIERÍA TISULAR VASCULAR

La **Ingeniería de Tejidos** o **Ingeniería Tisular** es una ciencia multidisciplinar que utiliza los principios y métodos de la ingeniería para desarrollar sustitutos biológicos que puedan restaurar, mantener o mejorar la formación de tejido (Langer y Vacanti, 1993). Para poder diseñar un sustituto biológico funcional (también llamado constructo o equivalente tisular), es necesario combinar una serie de elementos tales como células, soportes y señales. Estos tres elementos, conocidos como “la triada de la Ingeniería Tisular” (Naito y cols., 2011) constituyen los pilares sobre los que se sustenta este campo de la ciencia [figura 3]:

1. Las **células**, preferiblemente autólogas, se pueden aislar y expandir *in vitro* empleando técnicas de cultivo convencionales. En caso de que se obtengan poblaciones celulares diferenciadas, éstas deben ser similares a las presentes en el tejido nativo tanto fenotípica como funcionalmente. Por el contrario, si se obtienen células madre, éstas deben presentar potencial de diferenciación hacia la estirpe celular deseada.
2. Una vez cultivadas, las células se siembran sobre un **soporte**, también denominado andamio (*scaffold*). Estos soportes, ya sean bidimensionales o tridimensionales, deben tener una estructura y morfología semejante al tejido original que se pretende reemplazar. Los soportes tienen que permitir que las células lo colonicen, promoviendo así el desarrollo del tejido artificial mediante la expansión celular y la secreción de proteínas que componen la matriz extracelular.
3. Finalmente, es necesario emplear **señales** que estimulen a las células con el fin de promover la formación y la maduración del tejido artificial en el interior del soporte empleado. Dichas señales pueden ser estímulos biológicos, bioquímicos y/o mecánicos. En el caso concreto de la Ingeniería Tisular aplicada al territorio

vascular, el flujo sanguíneo a su paso por el constructo constituye un claro ejemplo de la interrelación existente entre estos tipos de estímulos.

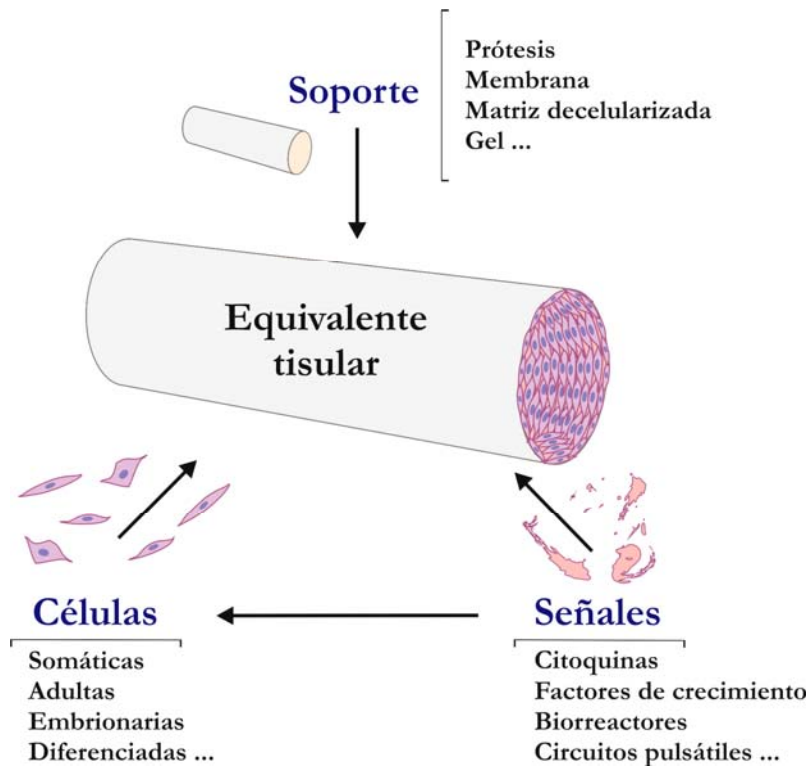


Figura 3: Esquema de los fundamentos de la Ingeniería Tisular [Modificado de Naito y cols., 2011].

Las técnicas de Ingeniería Tisular aplicadas al territorio vascular se están desarrollando desde mediados del siglo XX, cuando Voorhees y colaboradores propusieron el uso de estructuras tubulares sintéticas (vinion-N) para el reemplazo de vasos sanguíneos (Voorhees y cols., 1952). Estas prótesis primitivas se utilizaron dos años más tarde en un modelo *in vivo* (Blakemore y Voorhees, 1954), demostrando que la idea de emplear un material sintético para reemplazar un vaso sanguíneo era viable. A partir de este hallazgo, el interés por encontrar el sustituto vascular ideal fue creciendo exponencialmente (Schmidt SP y Bowlin, 1999).

Otro descubrimiento relevante en este campo se produjo en la década de los 80, cuando Weinberg y Bell diseñaron un modelo de arteria artificial utilizando un biomaterial tubular sintético (tereftalato de polietileno, Dacron®), colágeno y células endoteliales, musculares y fibroblastos extraídos de arteria aorta bovina (Weinberg y Bell, 1986). Aunque el constructo que obtuvieron presentaba ciertas limitaciones, éste cumplía algunas de las características físicas y fisiológicas que lo asemejaban a los vasos sanguíneos nativos, siendo por tanto un modelo adecuado para realizar estudios *in vitro*.

El interés por diseñar un vaso sanguíneo artificial que tenga la capacidad de emular, no sólo la estructura, sino también las funciones fisiológicas de los vasos nativos, ha crecido notablemente en las últimas décadas, debido a que en la actualidad las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en el mundo, con cifras que alcanzan el 30% de *exitus* anuales según la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) (Kirton y cols., 2011).

1.5.1 Estructura y función de los vasos sanguíneos sanos

La pared de los vasos sanguíneos es muy compleja, y está formada por tres capas bien definidas que presentan funciones determinadas así como un espesor variable dependiendo del tamaño (pequeño, mediano o gran calibre) y tipo de vaso. Estas capas -desde el interior hacia el exterior del vaso- reciben el nombre de túnica íntima, túnica media y túnica adventicia [figura 4].

1.5.1.1 Túnica íntima

La túnica íntima es la capa más interna del vaso, y está en contacto directo con la sangre. Está formada por una monocapa de células endoteliales que descansan sobre una membrana basal de tejido conectivo, recibiendo el nombre de **endotelio**.

Las células endoteliales tienen fenotipo poligonal plano, y presentan un eje longitudinal orientado en la dirección del flujo sanguíneo. Esta estirpe celular tiene unas dimensiones medias de aproximadamente 5 μm de espesor, 50 μm de longitud y 15 μm de anchura (Limaye y Vadas, 2007). Una de las principales características que definen a esta estirpe celular es la presencia en su membrana de CD31 (PECAM-1), molécula de adhesión que interacciona con las proteínas de tipo integrina presentes en la membrana de estas células, aumentando la fuerza en la adhesión celular tanto al sustrato como a las células vecinas (Dejana, 1996). Otra proteína íntimamente relacionada con las células endoteliales es la CD34, glicoproteína que actúa como un factor de adhesión célula-célula (Puri y cols., 1995). Además, las células endoteliales poseen en su citoplasma unas estructuras denominadas cuerpos de Weibel-Palade, depósitos de almacenamiento y liberación de la proteína P-selectina, que participa en la extravasación de leucocitos como respuesta a procesos inflamatorios, y del factor von Willebrand (vWF), proteína muy implicada en la coagulación sanguínea (Wagner y cols., 1982).

La disposición del citoesqueleto da a las células endoteliales una gran plasticidad: los microtúbulos y microfilamentos de actina, miosina y α -actinina se organizan formando estructuras reticulares que intervienen en los procesos de adhesión celular, tanto entre células vecinas como al sustrato (Ehringer y cols., 1999).

Las células endoteliales tienen una implicación muy relevante en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis se produce durante el desarrollo embrionario y es el proceso mediante el cual los angioblastos se diferencian formando islotes vasculares, que se fusionan gradualmente para formar una red capilar (Sumpio y cols., 2002). La angiogénesis es un proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Este proceso ocurre de forma natural, tanto en condiciones normales como en respuesta a un estado inflamatorio, isquémico o tumoral (De Angelis y cols., 1996).

Tanto la vasculogénesis como la angiogénesis están influenciados por la presencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este factor de crecimiento es una proteína de señalización que actúa fundamentalmente sobre las células del endotelio vascular, promoviendo su crecimiento y migración (Ferrara y cols., 2003; Coultas y cols., 2005), y participando en la regulación de la permeabilidad vascular (Yang y cols., 2011). Se ha observado que el VEGF actúa también sobre otras estirpes celulares de naturaleza no endotelial, tales como macrófagos, neuronas, células epiteliales y células tumorales (Matsumoto y Claesson-Welsh, 2001).

El VEGF interacciona con las células endoteliales vasculares a través de una serie de receptores de tipo tirosina quinasa presentes en la membrana de estas células: Flt-1, (VEGFR-1) y KDR (VEGFR-2). El receptor Flt-1 podría ser un regulador de la actividad del VEGF en el endotelio vascular (Ito y cols., 2001). El receptor KDR es a su vez el principal mediador de los efectos mitogénicos y angiogénicos del VEGF, ya que estimula la supervivencia de las células endoteliales vasculares (Holmes y cols., 2007).

Para el correcto funcionamiento del endotelio, es fundamental que la monocapa celular no sufra alteraciones. Por esto, las uniones celulares y diferenciaciones de membrana que presentan estas células son de naturaleza tal que permiten al endotelio comportarse como una lámina lisa, no porosa, impermeable, y relativamente elástica (Caveda y cols., 1994; Dejana y Del Maschio, 1995). Las células endoteliales, muy especializadas, presentan unos niveles de replicación bajos, así como un ciclo vital relativamente corto (Goldsmith y cols., 1984; Buján y cols., 1992a). A pesar de ello, la continuidad de la capa íntima no se ve alterada.

El endotelio constituye una barrera de permeabilidad selectiva que permite el intercambio de sustancias entre la sangre y los tejidos del organismo. Las células endoteliales cumplen múltiples funciones: sintetizan y secretan una variedad de sustancias que intervienen en los procesos de coagulación, inhiben la adhesión de

leucocitos y plaquetas, actúan como barrera mecánica ante los compuestos disueltos en el plasma, y finalmente, regulan el tono -dilatación y constricción del vaso-, el crecimiento y la remodelación vascular (Pries y Kuebler, 2006; Song y cols., 2011).

1. Barrera de permeabilidad selectiva: Una de las funciones más importantes del endotelio consiste en controlar el paso de sustancias a través de la pared del vaso sanguíneo. Dependiendo del tamaño de la molécula, ésta será capaz de atravesar la barrera endotelial a través de la superficie celular (moléculas hidrosolubles de pequeño tamaño), o las uniones celulares del endotelio (aminoácidos, glucosa, cationes y aniones). Las moléculas insolubles difunden a través de la bicapa lipídica (Scow y cols., 1976), y las grandes macromoléculas podrían cruzar por los poros presentes entre las uniones celulares, o vehiculizadas en vesículas a través del plasmalema (Simionescu y cols., 1987; Michel, 1992). El endotelio está íntimamente relacionado con una serie de agentes vasoactivos que incrementan la permeabilidad de los vasos. Algunos de los agentes que actúan directamente sobre el endotelio son: bradiquinina, histamina, leucotrienos, intermediarios reactivos del oxígeno, y factor activador de plaquetas. Otros tienen una vía de actuación indirecta, como por ejemplo: prostaglandinas, interleuquinas, factor de necrosis tumoral y endotoxinas.
2. Función metabólica: Las células endoteliales sintetizan y secretan sustancias que influyen directa o indirectamente sobre los procesos de coagulación sanguínea, presión arterial y flujo sanguíneo local. Algunos de las sustancias más relevantes son: prostaglandinas y prostaciclina, proteína S, nexina, factor V de coagulación, ácido 13-hidroxiocetadecanoico, inhibidor del activador de plasminógeno, vWF, trombospondina, trombomodulina, tromboplastina, interleuquina-1, PDGF, TGF- β 1, factor relajante derivado de endotelio, óxido nítrico, factor hiperpolarizante derivado de endotelio, endotelina, angiotensina II, enzima convertidora de angiotensina, y otros componentes de la matriz subendotelial:

colágenos III, IV y VI, elastina, laminina, fibronectina, y las metaloproteinasas de matriz (Moncada y cols., 1976; Moncada y Vane, 1979).

3. Función hemostática: Las células endoteliales participan activamente en los procesos de regulación hemostática como fuente de actividades anticoagulantes, antiplaquetarias, procoagulantes, activadoras de plaquetas y fibrinolíticas (Luscher y Barton, 1997). Es fundamental que estos procesos estén integrados, tanto para prevenir los fenómenos de coagulación y mantener el flujo sanguíneo, como para responder rápidamente en caso de pérdida sanguínea. El equilibrio entre las actividades antitrombóticas y protrombóticas determina si se produce la formación del trombo, o su disolución.
4. Regulación del tono vascular: Las células endoteliales contribuyen a la regulación de la presión arterial y del flujo sanguíneo mediante la liberación de sustancias tanto vasodilatadoras -óxido nítrico, prostaglandinas y prostaciclina- como vasoconstrictoras -endotelina-1, factor activador de plaquetas y angiotensina II (Luscher y Tanner, 1993).
5. Angiogénesis: El endotelio vascular interviene en la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la degradación proteolítica de la membrana basal y la matriz extracelular, procesos que estimulan la migración y proliferación de las células endoteliales, y favorecen la formación de nuevas redes capilares.
6. Remodelación vascular: Las células endoteliales están implicadas en procesos patológicos como inflamación, reparación tisular, crecimiento tumoral y metástasis, aterogénesis, o reacciones inmunológicas. Ante la presencia de determinados estímulos inflamatorios, la superficie del endotelio puede volverse protrombogénico y antifibrinolítico, promoviendo de este modo, la activación de los procesos de coagulación (Poher y cols., 1996).

1.5.1.2 Túnica media

La túnica media constituye la capa intermedia de la pared vascular. Está formada principalmente por células musculares lisas conectadas entre sí mediante uniones de tipo GAP y pequeñas cantidades de colágeno. Estas células, de fenotipo fusiforme y contráctil, se orientan paralelamente a la dirección del flujo sanguíneo (Madri y cols., 1980) y están envueltas por una membrana basal incompleta formada por microfibrillas de colágeno y reticulina (Thyberg y cols., 1997).

La mayor parte del citoplasma de las células musculares está formado por un aparato contráctil que contiene filamentos de α -actina, miosina, desmina y vimentina, que se emplean típicamente como marcadores bioquímicos de diferenciación celular. Bajo condiciones fisiológicas normales, las células musculares se disponen paralelas entre sí y con un grado de solapamiento que oscila entre el 50 y el 70%. La contracción a la que están sometidas estas células es de tipo isométrico (Gabella, 1984).

Las células musculares lisas de la túnica media sintetizan elastina (Martin BM y cols., 1992), que es secretada a la matriz extracelular en forma de tropoelastina. Una vez secretada, la tropoelastina sufre una serie de modificaciones, adquiriendo una estructura fibrilar (Hinek y cols., 1992). La elastina puede organizarse formando láminas elásticas, las cuales se disponen formando capas concéntricas alrededor de la luz arterial. Cada lámina elástica proporciona la resistencia que las arterias necesitan para absorber el estrés hemodinámico de la sístole cardíaca y liberar esta energía en forma de presión sanguínea sostenida durante la diástole. Junto a la elastina, las células musculares lisas sintetizan otros componentes de la matriz extracelular como: colágenos de tipo I, III, V, VI, XII y XIV, laminina, fibronectina y trombospondina (Mumby y cols., 1984; Giachelli y cols., 1993).

La túnica media constituye un tejido multifuncional, contráctil que aporta a las arterias las propiedades mecánicas necesarias para soportar la fuerza ejercida por el flujo

sanguíneo, así como la capacidad de llevar a cabo una actividad proliferativa y reparativa en respuesta a la agresión (Salacinski y cols., 2001; Song y cols., 2011).

1.5.1.3 Túnica adventicia

La túnica adventicia es la capa más externa del vaso, y está compuesta de tejido conjuntivo, proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágeno. Entre los componentes celulares se encuentran fibroblastos, algunas células musculares lisas, adipocitos y pericitos.

Los fibroblastos presentan una morfología fusiforme con varias prolongaciones y tienen la función de sintetizar diferentes proteínas fibrosas, sustancia amorfa y el protocógeno, que es la molécula precursora del colágeno. Los pericitos son un tipo celular que cumple un papel muy importante en el mantenimiento de la pared vascular, ya que participan activamente en los procesos de reparación arterial como consecuencia de un daño en la pared vascular (Díaz-Flores y cols., 1990; Buján y cols., 1992a; Abedin y cols., 2004; Collet y Canfield, 2005).

El resto de la capa está formado por una resistente red de fibras de colágeno de tipo I, y pequeñas cantidades de elastina y reticulina. Las fibras de colágeno confieren al tejido conectivo resistencia a la tracción, mientras que las fibras elásticas aportan elasticidad. La adventicia contiene también una red de fibras nerviosas vasomotoras amielínicas (Sander y cols., 1995), que termina en las células musculares de la túnica media, y algunas fibras mielínicas que alcanzan la túnica íntima (Song y cols., 2011).

La túnica adventicia contiene pequeñas redes vasculares y linfáticas. Los vasos de la llamada *vasa vasorum* forman una amplia red transversal que se prolonga hacia la túnica media, favoreciendo el mantenimiento metabólico de la pared vascular (Díaz-Flores y cols., 2007). La red linfática se dispone paralela a la *vasa vasorum*, y tiene la función de mantener la homeostasis vascular, permitiendo el drenaje de agua,

macromoléculas y lípidos, con el fin de evitar su acumulación entre los tejidos de la pared.

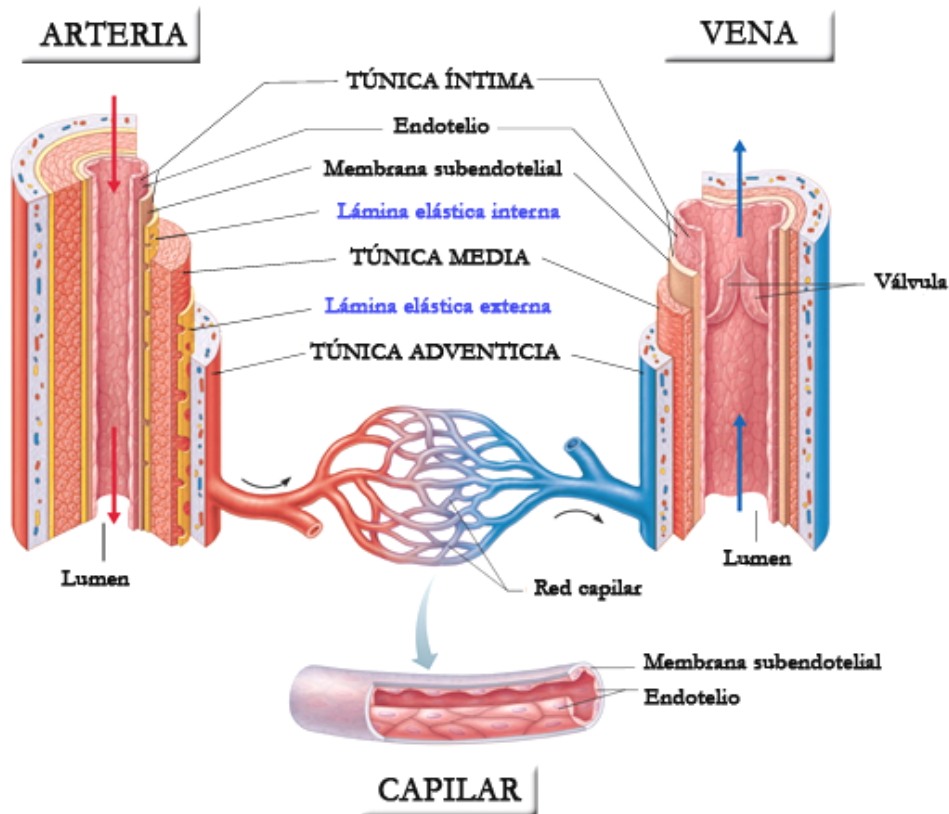


Figura 4. Componentes de la pared vascular [Modificado de Marieb, 2009].

1.5.1.4 Matriz extracelular

En la pared vascular, la matriz extracelular se localiza en los espacios extracelulares e interfibrilares, aportando al vaso resistencia mecánica, elasticidad e integridad estructural. Formada principalmente por colágenos y elastina, su composición y estructura varían en función del diámetro, naturaleza y localización anatómica. Gracias a la presencia de glicoproteínas estructurales y proteoglicanos, las proteínas de la matriz extracelular mantienen una importante cohesión con las células y proteínas fibrosas presentes en el tejido.

1. Colágeno: El colágeno de la matriz extracelular juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura vascular, aunque también está implicado en el desarrollo del tejido, y los procesos quimiotácticos asociados a la adhesión celular y la agregación plaquetar (Ottani y cols., 2001). De todos los colágenos presentes en la pared vascular, los de tipo I y III son los más abundantes, y representan respectivamente el 60% y el 30% del contenido total de colágeno (Van der Rest y Garrone, 1991).
2. Elastina: Junto al colágeno, la matriz extracelular contiene gran cantidad de elastina. Esta proteína no sólo constituye las láminas elásticas de la túnica media, sino que forma fibras elásticas que se disponen entre las células musculares de esta capa, representando el 90% del total del componente elástico de la túnica media. El 10% restante está formado por glicoproteínas asociadas a elastina y a las fibras elásticas, tales como fibrilinas 1 y 2, fibulina 5 y glicoproteínas asociadas a microfibrillas (MAPG) (Kielty y cols., 2002).
3. Proteoglicanos: Los proteoglicanos son otro componente estructural importante para la matriz extracelular. Localizadas fundamentalmente en la túnica íntima, estas moléculas hidrofóbicas aportan a las arterias las propiedades de viscoelasticidad y turgencia, y participan en la regulación de la permeabilidad, la hemostasis y el metabolismo lipídico, entre otras funciones (Wight y cols., 1992).
4. Glicoproteínas: Las glicoproteínas favorecen la interacción de las células con los componentes de la matriz extracelular. Las más abundantes son: fibronectina, responsable de asegurar la cohesión entre la membrana celular y la matriz extracelular, laminina, implicada en la formación de matriz y en el anclaje entre las células y el colágeno (Hallmann y cols., 2005), tenascina, implicada en los procesos de vasculogénesis (Erickson, 1993) y trombospondina, relacionada con proteínas plasmáticas como fibrinógeno y plasminógeno (Majack y cols., 1988).

5. Metaloproteinasas: Son proteínas que actúan degradando la matriz extracelular vascular. Dependiendo del sustrato sobre el que actúan, las metaloproteinasas pueden ser: colagenasas, si degradan colágenos de tipo I y III (Chowcat y cols., 1990), gelatinasas, si actúan sobre los componentes de la membrana basal y el colágeno parcialmente degradado (Dollery y cols., 1995), estromelinas, si degradan proteoglicanos, laminina y fibronectina (Clavel y cols., 1992), y matrilsinas, si degradan proteoglicanos, y proteínas del tipo caseína, elastina, fibronectina, gelatina y vitronectina (Imai y cols., 1995).

1.5.2 Daño arterial y reparación

Patologías arteriales de la talla de la arteriosclerosis, la aparición de aneurismas, o procesos estenóticos, suelen dar lugar a lesiones en la pared vascular, en ocasiones de forma irreversible. Estas lesiones pueden tener un origen muy diverso: metabólico, infeccioso, inmune, genético, e incluso mecánico (Buján y cols., 2006a). Procesos fisiológicos como el envejecimiento son responsables también de la aparición de lesiones vasculares en la pared arterial (Liu y Chen, 2012).

La fisiopatología del daño arterial se puede clasificar en cuatro categorías [Figura 5], dependiendo de la severidad de la lesión y la afectación que ésta tiene sobre la funcionalidad del vaso (Ip y cols., 1990; Fuster y cols., 1992; Yeo y cols., 2008):

1. Lesión de tipo I: Se producen alteraciones funcionales en el endotelio, sin que se produzcan cambios morfológicos relevantes en la túnica íntima.
2. Lesión de tipo II: El daño provocado en la túnica íntima produce denudación endotelial, sin que se llegue a ver afectada la lámina elástica interna.
3. Lesión de tipo III: El grado de la lesión es tan elevado que se produce denudación endotelial y daños en las tunicas íntima y media.

4. Lesión de tipo IV: En algunas ocasiones, el grado de la lesión vascular es tan grande que afecta desde el endotelio hasta la túnica adventicia, pudiendo llegar a producir la perforación del vaso en los casos más graves (Yeo y cols., 2008).

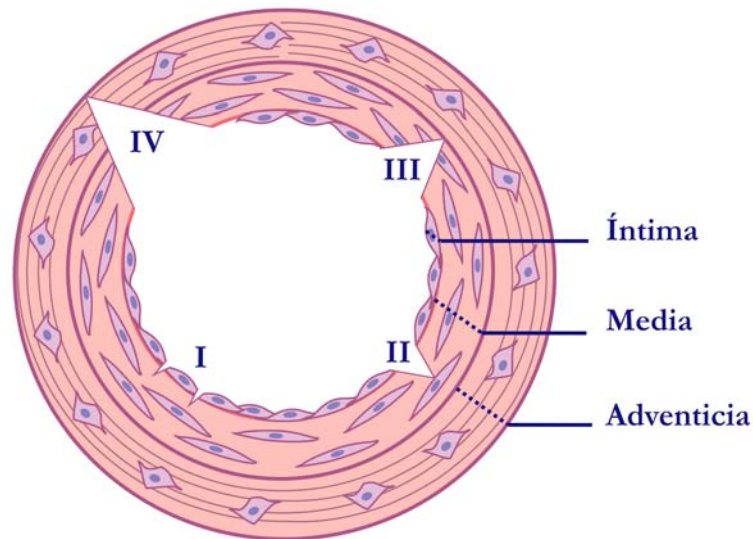


Figura 5: Esquema de los distintos tipos de lesión vascular [Modificado de Ip y cols., 1990].

Las lesiones arteriales se relacionan con procesos ateroscleróticos en los que se suceden una serie de cambios estructurales en la pared del vaso que conllevan estenosis, formación de placas de ateroma, trombosis y oclusión vascular (Buján y cols., 2006a). Otro de los eventos relacionados con las lesiones arteriales es el desarrollo en el lumen vascular de una nueva capa denominada **neointima**, que se origina mediante la proliferación y migración de células musculares lisas procedentes de la túnica media (formación de una capa mioíntima), junto con la migración de células endoteliales, y la síntesis y deposición de proteínas de la matriz extracelular (García-Honduvilla y cols., 2008). Este proceso inflamatorio, denominado **hiperplasia intimal**, puede conllevar la aparición de un proceso estenótico, que reduce la luz del vaso, llegando incluso a ocluirlo por completo en los casos más graves.

Este tipo de lesiones crean por tanto la necesidad de recurrir al uso de sustitutos vasculares -biológicos o artificiales- con el fin de reemplazar el vaso dañado. Los sustitutos biológicos más empleados en clínica son de tipo autólogo (vasos procedentes del propio paciente), alogénico (vasos procedentes de donantes, frescos o criopreservados) o xenogénico (vasos cuyo origen proviene de especies animales diferentes a la del individuo receptor).

Aunque el uso de **vasos autólogos** constituye la opción ideal, no siempre es posible recurrir a esta estrategia debido a que en un considerable número de situaciones -entre el 10% y el 30% de los casos- no es factible obtener vasos del paciente por diversas causas tales como traumas, patologías vasculares de base, o intervenciones quirúrgicas previas (Hamilton, 2009; Song y cols., 2011). La obtención de vasos autólogos supone también un riesgo de morbilidad muy alto para el paciente, ya que las técnicas quirúrgicas empleadas son altamente invasivas, y esto es en muchas ocasiones incompatible con la salud del propio paciente (Krawiec y Vorp., 2012).

En aquellas situaciones en las que el paciente no tiene posibilidad de recibir un injerto autólogo, es frecuente recurrir al uso de **sustitutos alogénicos**, tanto frescos como criopreservados. Los aloinjertos pueden ser muy beneficiosos, ya que conservan las propiedades estructurales y biomecánicas del vaso nativo (Pascual y cols., 2004a), pero su uso está limitado por la disponibilidad de donantes y condicionado a la necesidad de obtener un vaso de calibre y longitud adecuados para el paciente (Stitzel y cols., 2006). Otra limitación importante que afecta a este tipo de injertos es provocada por la posible respuesta inmune que podría comprometer el éxito del trasplante (Rodríguez y cols., 2012).

Los **xenotrasplantes** suponen una alternativa al uso de vasos de origen autólogo o alogénico. Sin embargo, al tratarse de vasos de origen animal, surgen una serie de barreras de tipo inmunológico, fisiológico y ético que dificultan el uso extensivo de este tipo de trasplantes (Tisato y Cozzi, 2012).

Los **biomateriales** empleados como sustitutos artificiales suponen una buena alternativa al uso de injertos biológicos, y su uso podría eliminar a problemática de asociada a los vasos sanguíneos autólogos, alogénicos y xenogénicos (Nieponice y cols., 2008). Los biomateriales más empleados en cirugía vascular están fabricados con polímeros sintéticos como tereftalato de polietileno (Dacron®) o politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). Ambos están compuestos por materiales inertes, antiadherentes, hidrófobos y con una superficie altamente electronegativa (Esquivel y Blaisdell, 1986; Nieponice y cols., 2008). Al no ser biodegradables, estos injertos presentan una elevada durabilidad; sin embargo, su rendimiento puede llegar a ser muy negativo cuando se emplean en la reparación de vasos de pequeño calibre, cuyo diámetro interno es inferior a 6 mm (Hamilton, 2009), ya que la combinación de una superficie trombogénica con el pequeño diámetro interno dan lugar al fracaso por oclusión del injerto (Kadner y cols., 2004).

Esquivel y Blaisdell postularon una serie de justificaciones por las cuales fracasan los biomateriales de pequeño calibre (Esquivel y Blaisdell, 1986). Estos motivos relacionan la superficie del biomaterial con la composición y la velocidad del flujo sanguíneo tras realizar el injerto: durante el periodo postoperatorio, la composición sanguínea puede verse modificada, aumentando la adhesión plaquetar y reduciendo la actividad fibrinolítica. La velocidad del flujo sanguíneo también sufre alteraciones, pudiendo llegar a un umbral mínimo de velocidad por debajo del cual la trombosis está casi garantizada. Además, si la superficie del biomaterial no es adecuada (ya sea por su composición o por un daño causado por el instrumental quirúrgico), ésta puede promover el desarrollo de hiperplasia intimal y trombosis.

En las últimas décadas se han buscado posibles estrategias que modifiquen y mejoren la superficie la superficie luminal de los biomateriales de Dacron® y ePTFE, con el fin de reducir la formación de hiperplasia intimal y por tanto el riesgo de trombosis. Una de las estrategias más revolucionarias consiste en emplear células endoteliales para tapizar la superficie luminal del biomaterial, formando un endotelio

artificial con células funcionales. Este concepto se conoce como **siembra endotelial** y fue propuesto por el grupo de Herring en un intento de mejorar la permeabilidad de los injertos de pequeño calibre (Herring y cols., 1978).

La siembra de células en la superficie luminal de las prótesis vasculares en territorio arterial ha sido estudiada en profundidad, al considerarse una herramienta muy útil para la optimización de los injertos vasculares. Se han publicado numerosos trabajos en los que se demuestra la efectividad de la siembra endotelial en ensayos *in vitro* bajo condiciones estáticas (Bellón y cols., 1992; Bellón y cols., 1997; Feugier y cols., 2005). Sin embargo, la siembra endotelial va ligada a una dificultad a la hora de obtener un número suficiente de células endoteliales autólogas, algo que podría llegar a requerir el uso de vasos sanguíneos de gran calibre o de longitud considerable, cosa que no es viable en el caso de pretender obtener poblaciones de células autólogas. El elevado grado de diferenciación que presentan estas células es también un inconveniente, ya que su esperanza de vida en cultivo es relativamente baja (Unterluggauer y cols., 2008), de modo que las células dejan de ser funcionales a partir del tercer subcultivo (Rodríguez-Morata y cols., 2008).

A la dificultad de obtener un número adecuado de células endoteliales y de su corta vida en cultivo hay que añadir otro obstáculo, que es la eficacia de la siembra: bajo condiciones fisiológicas, la fuerza adhesiva de las células endoteliales está mediada por las interacciones célula-matriz extracelular y por proteínas de tipo integrina que conectan los sitios de unión de la matriz extracelular con las placas de adhesión intracelulares (Dardik y cols., 1999). En el caso de la siembra celular, las células endoteliales se adhieren a la superficie del biomaterial en condiciones estáticas pero, una vez restablecido el flujo sanguíneo, gran parte de las células no son capaces de resistir el estrés mecánico de la sangre a su paso por el injerto, produciéndose una denudación endotelial en el biomaterial (Imbert y cols., 1998). En estas situaciones, la efectividad del injerto se ve reducida y la siembra celular no es capaz de reducir el riesgo de agregación plaquetar, hiperplasia intimal y trombosis (Bellón y cols., 1994b).

En un intento de incrementar la resistencia mecánica de la siembra celular se ha recubierto la superficie luminal del biomaterial con diversas proteínas antes de realizar la siembra, con el fin de mejorar la adhesión de las células endoteliales al injerto. Las proteínas más utilizadas son fibronectina (Thomson y cols., 1991; Bellón y cols., 1992; Vohra y cols., 1992; Meinhart y cols., 1997), fibrina, (Niu y cols., 1991), colágenos I y III (Kaehler y cols., 1989; Feugier y cols., 2005) y más recientemente, matrigel (Randone y cols., 2005). Si bien la efectividad de la siembra aumenta con el uso de estas moléculas de adhesión, no evitan la denudación endotelial del biomaterial una vez restablecido el flujo sanguíneo, ya que aproximadamente el 40% de las células sembradas se pierde tras 1 h, y este porcentaje incrementa hasta alcanzar el 80% de denudación endotelial pasadas 24 h (Rosenman y cols., 1985). Esta denudación tan acusada en el injerto se observa también cuando el biomaterial es sometido a flujo pulsátil en un circuito *in vitro* (Bellón y cols., 1993).

Las moléculas de adhesión se han utilizado también en combinación con fibroblastos, creando una matriz artificial en un intento de emular la membrana subendotelial de los vasos sanguíneos, y facilitando así el anclaje y la resistencia mecánica de las células endoteliales sembradas en la prótesis (Buján y cols., 1992a; Bellón y cols., 1993; Bellón y cols., 1997; García-Honduvilla y cols., 2008).

El uso de estirpes celulares diferentes a la endotelial para recubrir el lumen de las prótesis vasculares es otra estrategia enfocada a mejorar la permeabilidad de los injertos. La estirpe celular seleccionada ha de tener la capacidad de sustituir al endotelio, llevando a cabo las funciones que éste desempeña en los vasos nativos. Debido a su parecido fenotípico, las células mesoteliales de epiplón han sido candidatas a sustituir a las células endoteliales, probando su eficacia con modelos *in vitro* (Thomson y cols., 1989; Pronk y cols., 1994), *ex vivo* (Buján y cols., 1998) e *in vivo* (Verhagen y cols., 1998).

En los últimos años, la búsqueda de la estirpe celular candidata a la sustitución de las células endoteliales se ha centrado en las células madre, debido a que son células con

gran potencial de diferenciación multilineaje. Además, estas células podrían emplearse en la diferenciación hacia células musculares lisas, pudiendo diseñar *in vitro* un injerto vascular que presente tunicas íntima y media (Kirton y cols., 2011). En la actualidad se piensa que las células madre adultas pueden ser estirpes celulares adecuadas para este fin, gracias a sus características de autorrenovación, proliferación y escasa (Weber y cols., 2011a) o nula tumorigenicidad post-implante (Gauthaman y cols., 2012a-b). Dentro del amplio abanico de células madre adultas, las células mesenquimales de médula ósea constituyen la opción más adecuada, al haberse demostrado su capacidad de diferenciación *in vitro* hacia las estirpes endotelial y muscular lisa, y su funcionalidad en un modelo animal de infarto de miocardio (Davani y cols., 2003; Gojo y cols., 2003; Cho SW y cols., 2005). Las células progenitoras de la línea endotelial se pueden obtener a partir de la sangre umbilical y de individuos adultos, y constituyen otra alternativa adecuada para su uso en aplicaciones destinadas a reparar defectos vasculares, ya que estas células son una estirpe programada para diferenciarse hacia la línea endotelial (Griese y cols., 2003; He y cols., 2003; Schmidt D y cols., 2006; Ranjan y cols., 2009).

Sin embargo, a pesar de todos los hallazgos logrados hasta la fecha, no ha sido posible diseñar un sustituto vascular totalmente efectivo, sobre todo cuando su aplicación va dirigida a vasos de pequeño calibre (Song y cols., 2011). La mayoría de los implantes arteriales que se utilizan en la actualidad no tienen la suficiente habilidad para cicatrizar y restaurar la integridad tisular sin promover al mismo tiempo la hiperplasia intimal (Davids y cols., 1999) debido a que son mecánica, fisiológica o funcionalmente inadecuados (Stitzel y cols., 2006). En muchas ocasiones esto es debido a que el biomaterial seleccionado como soporte no presenta las características bioquímicas, microestructurales y mecánicas típicas del tejido sano (Langer y Vacanti, 1993).

La elección del biomaterial adecuado es muy importante para lograr un equivalente tisular efectivo, con independencia del tejido que se pretenda reparar. En primer lugar, es fundamental que los materiales empleados en Ingeniería Tisular y medicina regenerativa estén avalados por un certificado de *Buenas Prácticas de Laboratorio*

(BPL, también conocido como *Good Laboratory Practices, GLP*) emitido por la *Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA)* que permitan su aplicación clínica (Placzek y cols., 2009). Los biomateriales -ya sean bioestables o biodegradables- no pueden presentar toxicidad alguna, y en el caso de ser biodegradables deben mostrar una tasa de degradación controlada en el tiempo. Su arquitectura no sólo ha de favorecer la colonización y proliferación celular, sino que también debe permitir el intercambio de oxígeno, nutrientes y desechos metabólicos. Sus propiedades físicas han de proporcionarles resistencia frente al estrés mecánico así como la capacidad de integrarse en el tejido nativo (Guillot y cols., 2007; Polak y Mantalaris, 2008).

1.5.3 Biomateriales de ePTFE como sustitutos vasculares

El politetrafluoroetileno (PTFE) es un polímero fluorocarbonado que fue patentado bajo el nombre de Teflón® por la empresa multinacional DuPont™ en el año 1937. Mediante procesos de calentamiento, estrechamiento y extrusión de este material, se obtiene el **politetrafluoroetileno expandido (ePTFE)**, que a su vez fue patentado por la empresa W. L. Gore & Associates en 1969, bajo el nombre de Gore-Tex® (Chlupác y cols., 2009). Los biomateriales de ePTFE que se utilizan en cirugía vascular tienen aspecto tubular, son bioestables y presentan una superficie electronegativa, con el fin de minimizar las posibles reacciones al entrar en contacto con los distintos componentes de la sangre (Chlupác y cols., 2009).

En su superficie luminal se pueden diferenciar dos estructuras características: nodos e internodos. Los **nodos** están formados por membranas sólidas de aspecto irregular. De cada una de estas estructuras surgen una serie de fibrillas paralelas que conectan dos nodos adyacentes, y que se corresponden con los **internodos** [figura 6]. La distancia media entre dos nodos vecinos, llamada **distancia internodal**, es un parámetro fundamental que determinará la porosidad del biomaterial (Davids y cols., 1999). De este modo, los biomateriales de ePTFE pueden tener baja porosidad

(distancia internodal inferior a 30 μm), porosidad intermedia (distancia internodal entre 30 y 45 μm) o alta porosidad (distancia internodal superior a 45 μm).

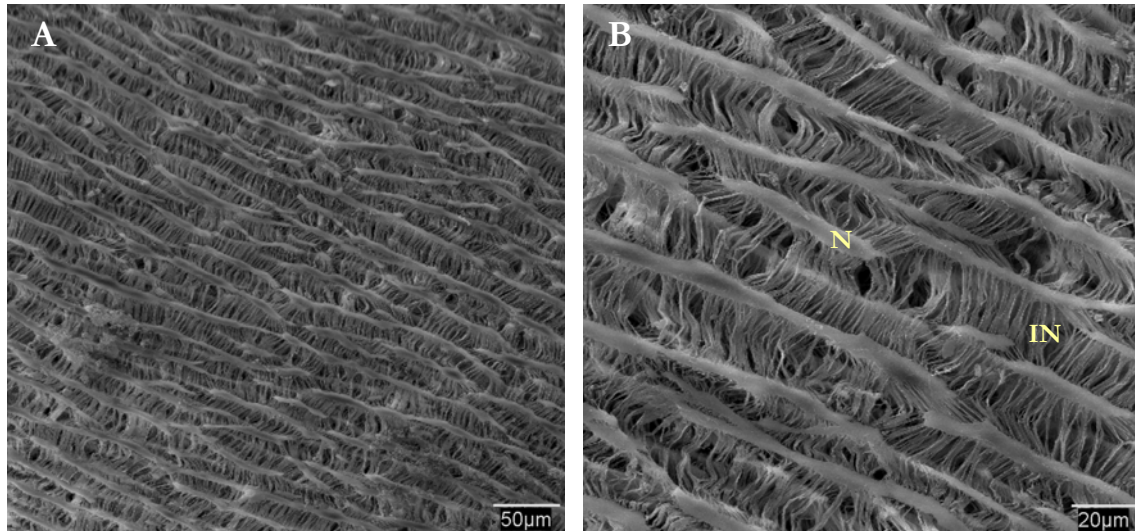


Figura 6: Aspecto que presenta la superficie luminal de una prótesis vascular de ePTFE de baja porosidad (distancia internodal inferior a 30 μm), a microscopía electrónica de barrido, a **(A)** 200 aumentos y **(B)** 500 aumentos. N = nodos; IN = internodos.

En los diferentes modelos experimentales en los que se han empleado biomateriales de ePTFE de baja porosidad, los procesos de cicatrización que se desencadenan tras realizar el injerto son similares con independencia del animal de experimentación empleado (Davids y cols., 1999; Zilla y cols., 2007). Estos procesos cicatrizales comienzan en las áreas anastomóticas y gradualmente van avanzando hacia el centro del biomaterial (Buján y cols., 2006a). Durante las primeras dos semanas post-implante, la superficie de la prótesis se recubre con una fina capa de fibrina de aproximadamente 10-20 μm de espesor (Herring y cols., 1984a), y en la pared del biomaterial aparecen macrófagos dispersos por los intersticios del ePTFE, aunque apenas se observa infiltración tisular (Graham y cols., 1982). En las sucesivas semanas, el espesor de la capa de fibrina se mantiene constante, pero su composición varía, pudiendo aparecer acúmulos de plaquetas y granulocitos. Con el paso del tiempo su espesor aumenta, alcanzando los 80-290 μm (Zilla y cols., 1994). El número de

macrófagos infiltrados en la pared del ePTFE se incrementa notablemente, sobre todo en las regiones luminal y adventicial del biomaterial. Además, surgen infiltraciones de tejido conjuntivo desde la región adventicial hacia la zona central de la pared del biomaterial (Sterpetti y cols., 1996).

En el caso de los biomateriales de ePTFE de alta porosidad, la velocidad en la respuesta cicatrizal es diferente dependiendo del animal de experimentación empleado (Davids y cols., 1999; Zilla y cols., 2007).

La capa de fibrina que recubre la superficie luminal del biomaterial actúa como lámina basal para las células endoteliales, facilitando su migración desde las zonas anastomóticas y su posterior proliferación, desencadenando un proceso conocido como **endotelización transanastomótica** (Zilla y cols., 2007). Gracias a esto, el biomaterial se recubre de forma natural por una capa de células endoteliales funcionales, permitiendo así la permeabilidad del injerto a largo plazo. Este proceso está influenciado por varios factores, siendo la especie animal sobre la que se realiza el injerto uno de los más importantes. La capacidad de endotelización transanastomótica es mayor en algunos animales que en otros. Por ejemplo, la capacidad para recubrir la superficie luminal de los injertos vasculares es mayor en las células endoteliales de mamíferos como el perro en comparación con las células de primates no humanos como el babuino (Zilla y cols., 2007).

Otro factor influyente en la endotelización transanastomótica del injerto vascular es la edad del individuo, ya que las células endoteliales pierden capacidad migratoria y proliferativa a medida que éste envejece (Zilla y cols., 1994). Las dimensiones anatómicas del individuo también son un parámetro a tener en cuenta, ya que se ha comprobado que la distancia del injerto vascular puede variar notablemente entre individuos de distintas especies, imposibilitando en muchos casos su comparación (Zilla y cols., 2007). Finalmente, la composición y superficie del biomaterial empleado influyen de forma significativa en los procesos de endotelización transanastomótica.

Por ejemplo, los biomateriales de ePTFE de baja porosidad resultan el doble de efectivas en comparación con prótesis de Dacron® (Zilla y cols., 2007).

Por desgracia, no es posible extrapolar a la clínica humana los fenómenos de endotelización transanastomótica observados en los modelos animales. Está demostrado que las células endoteliales humanas apenas llegan a recubrir distancias superiores a 1-2 cm en los implantes vasculares, incluso años después de haber realizado el injerto (Berger y cols., 1972), y esta distancia no es suficiente para recubrir la longitud total de la prótesis, que en algunos casos puede alcanzar los 40-60 cm, como por ejemplo en los injertos de *by-pass* periféricos (Zilla y cols., 2007).

1.5.4 Perspectivas de futuro en la sustitución vascular

A pesar de los innumerables estudios que se han llevado a cabo en las últimas décadas con el fin de diseñar el sustituto vascular “ideal”, en la actualidad aún existen una serie de limitaciones que condicionan su posible traslación a la clínica. La mayoría de los implantes vasculares sintéticos que se utilizan hoy en día tienen una permeabilidad muy baja, impidiendo el crecimiento transmural del tejido, lo que dificulta la formación de una capa neoadventicial y la integración de la prótesis al vaso sanguíneo. Junto a esto, la escasa capacidad de las células humanas de llevar a cabo la endotelización transanastomótica impide el desarrollo de un endotelio plenamente funcional, aumentando el riesgo de hiperplasia intimal y trombosis.

Recientemente se están planteando estrategias tales como recurrir al uso de biomateriales biodegradables -de origen natural o sintético- en sustitución de los tradicionales implantes de ePTFE o Dacron® que permitan la integración tisular al tener una arquitectura más fisiológica (Kirton y cols., 2011), o el diseño de biomateriales capaces de liberar de forma controlada factores de crecimiento u otras señales que favorezcan la remodelación tisular y la integración del injerto (Guillot y cols., 2007).

La Ingeniería Tisular aplicada al territorio vascular está centrando su atención en el desarrollo de sustitutos vasculares “vivos” que desarrollen la capacidad de emular de forma eficaz todas las características físico-químicas de los vasos sanguíneos nativos (Zhang y cols., 2007), y que puedan imitar los procesos de remodelación que de forma natural ocurren en los vasos sanguíneos (Critser y cols., 2011). Se presente lograr que este tipo de sustitutos posean un endotelio funcional, una túnica media con células musculares contráctiles metabólicamente activas, y una capa adventicial que facilite la integración tisular del injerto (Muto y cols., 2007). Su estructura debe contener colágeno y elastina en proporciones semejantes a los vasos nativos, de manera que el constructo tenga unas propiedades viscoelásticas deseables, y en la medida de lo posible, debe carecer de cualquier material sintético que pudiera desencadenar una reacción a cuerpo extraño y sus consecuentes procesos inflamatorios o infecciosos (Chlupác y cols., 2009).

Para facilitar el diseño de estos sustitutos vasculares se están empleando herramientas computacionales y tecnológicas avanzadas (Pancrazio y cols., 2007). El uso de biorreactores para el diseño y cultivo de sustitutos vasculares constituye un claro ejemplo de este tipo de tecnologías. Gracias a los biorreactores se pueden reproducir en el laboratorio una serie de condiciones fisiológicas, bioquímicas y mecánicas adecuadas (temperatura, pH, osmolaridad, estés mecánico, etc) que estimulen a las células para llevar a cabo una regeneración tisular en condiciones *in vitro* (Pörtner y cols., 2005; Song y cols., 2011). En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios destinados a diseñar un sustituto vascular “vivo” mediante el cultivo con biorreactores (Niklason y Langers, 1997; Niklason y cols., 1999; Hoerstrup y cols., 2000; Seliktar y cols., 2000; Hoerstrup y cols., 2002; Niklason y cols., 2002; Sodian y cols., 2002; McCulloch y cols., 2004; Williams C y Wick, 2004; Gong y Niklason, 2006; Dahl y cols., 2011; Huang AH y Niklason, 2011). A pesar de los buenos resultados obtenidos con algunos de estos trabajos, sobre todo los correspondientes al grupo de Niklason, el diseño de vasos sanguíneos mediante técnicas de Ingeniería Tisular y su cultivo en biorreactores supone

un proceso muy complejo, que requiere largos periodos de tiempo y una inversión económica excesiva (Korossis y cols., 2005), lo que dificulta su aplicación a gran escala.

Los avances tecnológicos en el campo de la Ingeniería Tisular Vascular son muy prometedores, sin embargo, no han sido capaces de desplazar el uso clínico de las prótesis de ePTFE, que se mantienen en la actualidad como uno de los biomateriales más empleados en cirugía vascular. Es importante destacar que la superficie tan altamente electonegativa de este biomaterial hace que su lumen sea menos trombogénico que el de otros materiales -como por ejemplo el Dacron®- lo que facilita su uso, especialmente en aquellos territorios donde la velocidad del flujo sanguíneo es tan baja que podría condicionar el éxito de la sustitución vascular, tal y como sucede en las extremidades inferiores a partir de la región femoropoplítea (Poblete, 1994).

Las prótesis de ePTFE no sólo se utilizan en la sustitución de fragmentos arteriales dañados, sino que también se emplean en reparación endovascular, mediante la colocación de endoprótesis o *stents* con el fin de reparar lesiones como los aneurismas aórticos, o proporcionar una terapia eficaz a aquellos pacientes que, debido a su estado de salud, no pueden ser sometidos a grandes cirugías (Zhu A y cols., 2009).

En resumen, podemos afirmar que a pesar de los avances tan notables, no sólo en el diseño de sustitutos vasculares “vivos” sino también en las tecnologías empleadas a tal fin, es importante recordar que el ePTFE constituye uno de los biomateriales más empleados en la reparación y sustitución arterial, su efectividad ha sido demostrada en numerosas ocasiones, y permite ser utilizado en combinación con otros elementos que mejoran su permeabilidad, como el tratamiento con sustancias anticoagulantes (Dorigo y cols., 2012), la terapia con ultrasonidos (Brinton y cols., 2011), o la siembra celular (Vara y cols., 2011).

Capítulo 2

Hipótesis de trabajo y diseño experimental

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los biomateriales de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) se emplean con éxito en la sustitución de vasos de mediano y gran calibre. Sin embargo, la mayoría de estas prótesis fracasan cuando se utilizan en vasos cuyo diámetro interno es inferior a 6 mm, ya que los eventos fisiológicos que se desencadenan tras el implante ocluyen la luz vascular rápidamente. Este fracaso se produce, bien por la trombogenicidad de la pared artificial protésica, bien por la aparición de un fenómeno de reestenosis debido al desarrollo de un proceso hiperplásico en el lumen vascular conocido como hiperplasia intimal, o formación de la capa neoíntima.

La interposición de un biomaterial en el territorio arterial conlleva la exposición de una interfaz sangre-biomaterial que activa la cascada de la coagulación. Mediante un equilibrado balance entre factores procoagulantes y anticoagulantes, la monocapa endotelial es responsable de mantener la homeostasis del tejido sanguíneo. Por ello, un hecho prioritario en cirugía vascular es ofrecer sustitutos arteriales provistos de una superficie luminal inerte ante el flujo sanguíneo. En la actualidad no se ha encontrado este biomaterial, lo que hace de los constructos celulares una buena alternativa para inhibir la trombosis.

En el proceso de hiperplasia intimal se suceden diferentes etapas, comenzando con una fase hemostática (formación de un tapón de plaquetas y fibrina seguido de trombolisis o fibrinolisis), seguida de una fase inflamatoria (activación y migración de células inflamatorias), una fase proliferativa (cambio de fenotipo de contráctil a secretor en las células musculares lisas, con posterior proliferación de éstas y migración hacia el área lesionada) y finalmente, una fase de remodelación (modificaciones en la matriz extracelular). Cuando este proceso de defensa es muy exagerado o se produce un fenómeno de trombosis, nos enfrentamos a la necesidad de sustituir el vaso lesionado, con el alto riesgo de morbilidad que ello conlleva para el paciente. Debido a esto, y dado el alarmante incremento en el porcentaje de enfermedades arteriales periféricas, las

investigaciones más recientes en este campo de la medicina regenerativa van encaminadas al estudio de las posibles estrategias terapéuticas para minimizar la aparición de estos procesos oclusivos.

La siembra celular constituye una de las estrategias más revolucionarias diseñadas con el fin de reducir la formación de hiperplasia intimal. Se han llevado a cabo multitud de modelos experimentales utilizando animales de tamaño medio como perros y cerdos, que poseen un sistema vascular similar al humano en cuanto a dimensiones y funciones fisiológicas. En la mayoría de estos modelos se ha comprobado una mejora en la permeabilidad, calidad y durabilidad de los implantes vasculares cuando son recubiertos con células endoteliales. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado una terapia eficaz basada en la siembra celular, pues el porcentaje de fracaso sigue siendo elevado y no existe todavía un modelo óptimo que pueda ser extrapolable al ser humano.

Por otro lado, se sabe que las células endoteliales juegan un papel clave en el funcionamiento y homeostasis de los vasos sanguíneos. Sería por tanto fundamental que el sustituto vascular cuente con un endotelio sano y funcional, que pueda llevar a cabo sus funciones de barrera, intercambio de sustancias, actividad antitrombogénica-antitrombótica y síntesis de sustancias vasorreguladoras. Sin embargo, dado su elevado grado de especialización, las células endoteliales tienen un bajo poder de proliferación, lo que supone una limitación a la hora de expandirlas en cultivo durante largos periodos de tiempo. En ocasiones no es posible obtener un número de células suficiente para realizar la siembra celular, limitando aún más las probabilidades de éxito del sustituto vascular.

Otro gran problema que se nos plantea a la hora de utilizar células endoteliales es la fuente de obtención de las mismas. Una de las fuentes más idóneas ha sido, y sigue siendo, la vena del cordón umbilical. Sin embargo, debido al auge que ha supuesto la terapia celular y la utilización de las células madre de la sangre umbilical, cada vez se hace más complicado la donación de este tejido con fines de investigación, lo que ha

obligado a gran número de investigadores a buscar una alternativa válida a la utilización de esta fuente celular. A pesar de esto, la utilización del cordón umbilical sigue generando un gran interés dentro de la comunidad científica, ya que constituye una fuente muy accesible, económica, inagotable, no invasiva, y relativamente libre de controversias éticas y morales. De las distintas estirpes celulares presentes en el cordón umbilical, las células de la gelatina de Wharton parecen reunir los requisitos necesarios que ha de cumplir una estirpe celular candidata a ser utilizada en aplicaciones de terapia celular, ya que son células con un alto potencial de proliferación y capacidad de diferenciación multilinaje.

Se ha demostrado la efectividad de estas células en distintas aplicaciones terapéuticas utilizando modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. A día de hoy, son pocos los trabajos publicados en relación al potencial de uso de estas células en la reparación de daños en el sistema vascular. Por este motivo, y dado el gran interés por encontrar el sustituto vascular ideal, consideramos que es necesario profundizar en el estudio de esta estirpe celular, a fin de validar su posible utilización en Ingeniería Tisular aplicada al territorio arterial.

Así, nos planteamos dos hipótesis de trabajo:

“¿Son las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical una estirpe celular mesenquimal capaz de diferenciarse hacia la línea endotelial?”.

“¿Pueden estas células mejorar la permeabilidad de las prótesis de ePTFE de pequeño calibre?”.

Los objetivos que nos proponemos con el fin de dar respuesta a estas hipótesis son los siguientes:

1. Nuestro **primer objetivo** consistirá en el estudio de la población celular aislada de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, así como su potencial de diferenciación en un modelo experimental *in vitro*.
 - Aislamiento y expansión en cultivo de células de la gelatina de Wharton (WJC) y células endoteliales de vena umbilical (HUVEC).
 - Evaluación de las características morfológicas y fenotípicas de estas estirpes celulares, análisis de su viabilidad, capacidad proliferativa, y expresión génica durante los primeros cinco subcultivos.
 - Diferenciación de WJC hacia la estirpe endotelial. Comparación de esta nueva población (Dif-WJC) con respecto al comportamiento de WJC y HUVEC durante los primeros cinco subcultivos.

2. Una vez evaluadas estas estirpes celulares, llevaremos a cabo nuestro **segundo objetivo**, que consistirá en validar la eficacia de HUVEC, WJC y Dif-WJC en el diseño de constructos vasculares mediante un modelo experimental *in vivo*.
 - Diseño de constructos vasculares o equivalentes tisulares utilizando biomateriales de ePTFE de 30 μm de distancia internodal y 4 mm de diámetro interno, sembrados con las diferentes estirpes celulares:
 - Grupo I: Biomateriales sin siembra celular: **ePTFE control**.
 - Grupo II: Biomateriales sembrados con células endoteliales de vena umbilical: **ePTFE + HUVEC**.
 - Grupo III: Biomateriales sembrados con células de la gelatina de Wharton: **ePTFE + WJC**.
 - Grupo IV: Biomateriales sembrados con células de la gelatina de Wharton diferenciadas a la línea endotelial: **ePTFE + Dif-WJC**.

- Valoración de los constructos diseñados en condiciones de cultivo estáticas y dinámicas.

- Aplicación de los mismos en un modelo experimental de sustitución arterial: implante de constructos de 4 cm de longitud en la arteria femoral común de perros de raza Beagle. Evaluación morfológica, histológica e inmunohistoquímica de los implantes tras un tiempo de estudio de 60 días.

Capítulo 3

*Objetivo 1. Modelo
experimental in vitro*

3.1 OBJETIVO 1

El objetivo principal que nos planteamos en el presente capítulo consiste en el estudio de las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, y su capacidad de diferenciación endotelial en un modelo experimental *in vitro*.

Para ello, partiremos de una población de células aisladas del estroma de la gelatina de Wharton (WJC). Posteriormente, induciremos la diferenciación endotelial de dichas células, utilizando a tal efecto un medio de cultivo enriquecido con factor de crecimiento de células endoteliales, lo que supondrá el establecimiento de una nueva estirpe celular de WJC diferenciadas (Dif-WJC). Realizaremos los estudios en los subcultivos primero, tercero y quinto, los cuales se emplearán para llevar a cabo distintas técnicas con el fin de caracterizar la población celular de partida, indiferenciada (WJC) en comparación con la estirpe celular diferenciada (Dif-WJC).

La eficacia de la diferenciación endotelial la analizaremos mediante la comparación de la estirpe celular Dif-WJC con un grupo control constituido por células endoteliales de vena umbilical (HUVEC), que aislaremos de los mismos cordones de los que hemos obtenido las células previamente citadas.

Para el cumplimiento de este primer objetivo, llevaremos a cabo análisis morfológicos, fenotípicos, inmunocitoquímicos, proteicos y genéticos, así como estudios de crecimiento, viabilidad y proliferación celular. Los resultados que obtengamos nos aportarán la información necesaria para evaluar el comportamiento de estas células en cultivo.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 Preparación de medios de cultivo y enzimas proteolíticas

3.2.1.1 Medio Mínimo Esencial (MEM)

El MEM es el medio mínimo esencial empleado para la recogida, transporte y lavado de los fragmentos de cordón umbilical. Para su elaboración, se disuelven en 1 L de agua ultrapura 9,53 g de medio base liofilizado MEM (Gibco-BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 2,2 g de bicarbonato sódico $-\text{NaHCO}_3-$. A continuación, se esteriliza la solución utilizando un filtro Fast PES Bottle Top Filter (Nalge Nunc International, NY, USA) de 0,2 μm de diámetro de poro. Finalmente, se completa el medio base añadiendo un 1% (v/v) de una mezcla antibiótica/antimicótica (Gibco-BRL/Invitrogen) compuesta por: 10.000 U/mL de penicilina G sódica, 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomicina y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B. El medio se mantiene refrigerado a 4 °C hasta su utilización.

3.2.1.2 Medio 199 (M199)

El M199 se utiliza en el cultivo de HUVEC y en la diferenciación de WJC hacia la estirpe endotelial. En 1 L de agua ultrapura se disuelven 9,5 g de medio base liofilizado M199 (Gibco-BRL/Invitrogen) y 2,2 g de bicarbonato sódico $-\text{NaHCO}_3-$. La solución se esteriliza con un filtro Fast PES Bottle Top Filter de 0,2 μm de diámetro de poro y se alicuota en fracciones de 500 mL. Para completar el medio, cada una de estas fracciones se suplementa con un 20% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (Gibco-BRL/Invitrogen), 5 mL de L-Glutamina 200 mM (Gibco-BRL/Invitrogen), 1% (v/v) de la misma mezcla antibiótica/antimicótica utilizada con el medio MEM y 5 mL de factor de crecimiento de células endoteliales (ECGS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA) a concentración 20 µg/mL. El medio se almacena refrigerado a 4 °C hasta su utilización.

3.2.1.3 Medio 199 sin factor de crecimiento (M199 sin ECGS)

Este medio se utiliza únicamente en los procesos de subcultivo celular, con el fin de evitar que las WJC indiferenciadas entren en contacto con un factor de crecimiento que podría estimular su diferenciación no deseada. El medio base M199 se prepara y completa de la forma descrita previamente, a excepción del suplemento ECGS, que no se añade a la solución.

3.2.1.4 Medio AmnioMAX™-C100

Este medio posee una composición que permite a las células en cultivo mantener su estado de indiferenciación, por lo que se utiliza exclusivamente para el cultivo de las WJC indiferenciadas. A 450 mL de medio base estéril AmnioMAX™-C100 se añaden 75 mL de suplemento estéril AmnioMAX™-C100 Supplement (ambos productos de Gibco-BRL/Invitrogen). Se añade un 1% (v/v) de la mezcla antibiótica/antimicótica descrita anteriormente, y se almacena a 4 °C hasta su utilización.

3.2.1.5 Medio Eagle modificado de Dulbecco sin suero

Este medio (DMEM sin FBS) se utiliza exclusivamente para el cultivo de las células empleadas en los ensayos por inmunosorción ligado a enzima (ELISA). El medio está privado de suero para llevar el cultivo a un estado de quiescencia (al estar carentes de los factores mitogénicos que aportan los componentes del FBS, las células se detienen en la fase G₀ del ciclo celular). Partiendo de una solución comercial de 500 mL de medio base DMEM estéril, éste se completa con 5 mL de L-Glutamina 200 mM (Gibco-BRL/Invitrogen) y un 1% (v/v) de la mezcla antibiótica/antimicótica descrita previamente. El medio se almacena a 4 °C hasta su utilización.

3.2.1.6 Solución salina equilibrada de Hank (HBSS)

El HBSS se utiliza como tampón de lavado para los cultivos celulares. Partiendo de una solución comercial estéril de HBSS 10X sin calcio ni magnesio (Gibco-BRL/Invitrogen) se prepara una solución de HBSS 1X, diluyendo 100 mL de ésta en 900 mL de agua ultrapura estéril.

3.2.1.7 Colagenasa tipo I

La enzima colagenasa se emplea para facilitar el aislamiento celular de los distintos tejidos del cordón umbilical. Para preparar esta enzima se reconstituyen 100 mg de colagenasa tipo I (Gibco-BRL/Invitrogen) en 100 mL de MEM. A continuación se añaden 1,5 mL de cloruro cálcico -CaCl₂- 1 M. La solución se esteriliza con un filtro Acrodisc® Syringe Filter (Pall Corporation, NY, USA) de 0,22 µm de diámetro de poro y se alicuota en tubos de 10 mL que se almacenan congelados a -20 °C hasta su uso.

3.2.1.8 Tripsina-EDTA

Esta enzima se utiliza tanto en los procesos de aislamiento como de subcultivo celular. A partir de la solución comercial estéril de Tripsina-EDTA 10X (Gibco-BRL/Invitrogen) se prepara una solución de Tripsina-EDTA 1X, diluyendo 10 mL de ésta en 90 mL del tampón de lavado HBSS 1X. La solución se alicuota en tubos de 10 mL que se almacenan congelados a -20 °C hasta su utilización.

3.2.2 Aislamiento de células de cordón umbilical

Todos los cordones umbilicales empleados en este trabajo provienen de partos eutócicos que han tenido lugar en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Príncipe de Asturias” (Alcalá de Henares, Madrid). Estos han sido donados por madres sanas tras haber dado su consentimiento informado.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos empleado más de 150 cordones umbilicales, la mayoría de los cuales se han utilizado como fuente para la obtención de células. Además, se han destinado un total de 20 cordones para realizar los análisis histológicos pertinentes, que serán detallados en el apartado 3.2.10 “Estudios histológicos”.

3.2.2.1 Aislamiento de células endoteliales de vena umbilical

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se aíslan del tejido siguiendo la metodología descrita por Jaffe en 1973 (Jaffe y cols., 1973) que fue modificada posteriormente por Budd y sus colaboradores (Budd y cols., 1989).

En el momento del parto, el cordón umbilical se pinza por dos puntos distantes 10-15 cm entre sí y se corta a partir de la zona de pinzamiento, separando así el fragmento seleccionado del resto del cordón. Con este proceso obtenemos una sección de tejido de longitud adecuada que nos permitirá obtener un número óptimo de células endoteliales, garantizando así su crecimiento y expansión *in vitro*. Además, las pinzas empleadas nos aseguran que las células serán aisladas de un segmento de cordón cuyo endotelio venoso no ha sido sometido a ningún traumatismo mecánico externo, ya que la fracción de cordón a utilizar como fuente de obtención celular se encuentra dentro de las zonas de pinzamiento [figura 7].

Inmediatamente después de haber sido seccionado, el cordón umbilical se introduce en un frasco que contiene 100 ml de MEM y se transporta al laboratorio. Para garantizar el aislamiento de la mayor cantidad posible de células viables, todos los cordones se procesan dentro de las primeras 24 h post-parto, utilizando una campana de flujo laminar de clase II Telstar AV 30/70 Müller 220 V 50 MHz (Grupo Telstar SA, Terrassa, Spain), y manteniendo en todo momento unas condiciones de máxima limpieza y esterilidad.

El cordón se introduce en una placa Petri estéril de 20 cm de diámetro y se cortan ambos extremos con una cuchilla de bisturí, eliminando así las zonas de pinzamiento. A continuación se utiliza una pipeta tipo Pasteur para lavar externamente el cordón con 10 mL de MEM, dejando la superficie del tejido limpia y libre de restos sanguíneos. Una vez limpio se localiza la vena umbilical y ambos extremos se canulan utilizando racores bicónicos rectos de 4 mm (Nordson Corporation, OH, USA) los cuales se fijan al cordón con hilo de sutura de 2/0 (Ethicon Ltd, Somerville, NJ, USA). Terminada esta operación se coloca una llave de tres vías (Nordson Corporation) en cada uno de los extremos canulados del cordón [figura 7]. Una vez colocadas las llaves, se lava el lumen venoso haciendo pasar a través del interior de la vena 50 mL de MEM. Para ello se utiliza una jeringa Plastipak™ de 50 mL (BD Becton, Dickinson and company, NY, USA), y se controla que la presión ejercida sea la adecuada a fin de evitar lesiones en la capa endotelial. Con este proceso de lavado eliminamos los restos sanguíneos acumulados en el interior del vaso [figura 7].

Tras haber eliminado todo el MEM del interior de la vena se procede a rellenar la misma con 10 mL de colagenasa tipo I al 0,1%. Para ello, se utiliza una jeringa Plastipak™ de 10 mL y se cierra la llave de tres vías del extremo opuesto. Una vez rellena la vena, se cierra la otra llave, evitando así la pérdida de la colagenasa por los extremos. La placa Petri que contiene el cordón se cierra y se introduce en una estufa a 37 °C durante 15 min. Esta temperatura y tiempo de incubación permiten que la enzima actúe desprendiendo las células endoteliales de la pared venosa [figura 8]. Transcurrido este tiempo, y nuevamente en la cabina de flujo laminar, se utiliza la jeringa de 50 mL para hacer pasar 30 mL de MEM a través de la vena, recogiendo la suspensión celular resultante en un tubo Falcon™ de 50 mL (BD Becton, Dickinson and company). Las células se centrifugan a 200 g durante 7 min en una centrífuga GP Centrifuge (Beckman Coulter, Brea, Ca, USA). Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende en 4 mL de M199 completo. Esta suspensión celular se traspara a un frasco de cultivo de tipo Roux, cuya superficie de expansión es de 25 cm² (Asahi Glass Corporation Ltd, Tokio, Japan).

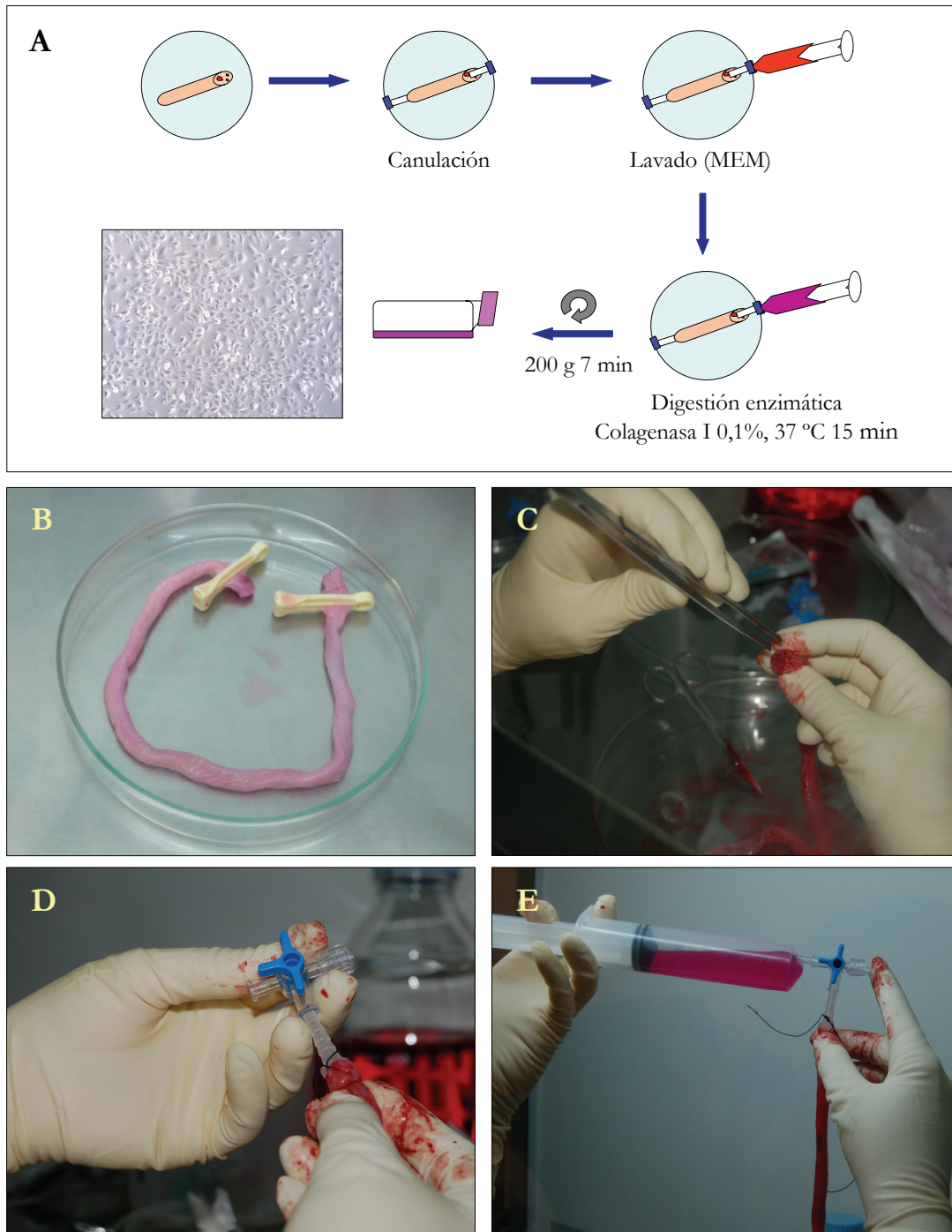


Figura 7: Extracción de células endoteliales de vena umbilical humana, HUVEC. **(A)** Esquema con el resumen del procedimiento. **(B)** Cordón umbilical recién donado. Se observa que los dos extremos del tejido están clampados, para proteger el lumen venoso. **(C)** Con ayuda de material quirúrgico estéril, se localiza la vena umbilical. **(D)** Aspecto de la vena tras ser canulada y conectada a una llave de tres vías. **(E)** El lumen venoso se lava con medio MEM para eliminar los restos de sangre.

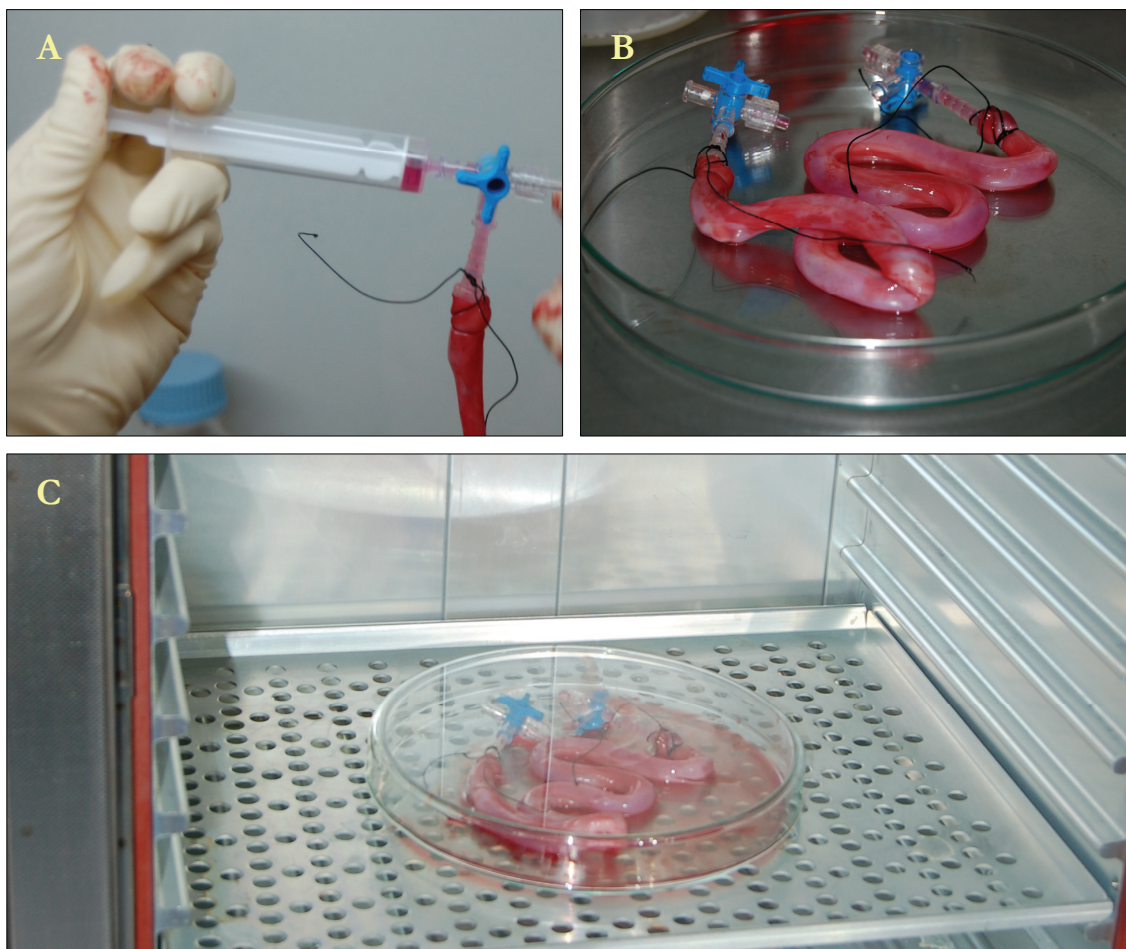


Figura 8: Extracción de células endoteliales de vena umbilical humana, HUVEC. **(A)** Una vez lavada, la vena se rellena con una solución de collagenasa I al 0,1%. **(B)** Aspecto del cordón cuando vez la vena está totalmente llena de collagenasa. **(C)** La digestión enzimática se realiza durante 15 min en el interior de una estufa a 37 °C. Pasado este tiempo, la suspensión celular se recoge, se centrifuga y el sedimento celular obtenido se siembra en frascos de cultivo.

Los frascos de cultivo se introducen en una estufa de incubación Series 8000 WJ CO₂ Incubator (Thermo Fisher Scientific Inc, DE, USA) calibrada a 37 °C, con atmósfera de 5% de CO₂ y humedad, ambiente apropiado para el óptimo crecimiento y expansión de los cultivos celulares.

3.2.2.2 Aislamiento de células de la gelatina de Wharton

Una vez finalizado el aislamiento de las HUVEC, se prepara el cordón para extraer las células mesenquimales de la gelatina de Wharton (WJC), componente mayoritario del cordón que rodea a los vasos umbilicales en toda su longitud. Para ello empleamos una modificación del método descrito por Wang y colaboradores (Wang HS y cols., 2004). Al igual que en el aislamiento celular anterior, el tejido se procesa en condiciones de máxima limpieza y esterilidad, utilizando la cabina de flujo laminar de clase II.

El cordón se introduce en una placa Petri estéril de 20 cm de diámetro y se lava externamente con 10 mL de MEM. Se utilizan dos pinzas hemostáticas rectas para localizar y pinzar las dos arterias umbilicales en uno de los extremos del cordón. Muy suavemente y con ambas manos se tira de las pinzas hemostáticas en direcciones opuestas, controlando que la fuerza ejercida no rompa los vasos en ningún punto de su longitud. Este movimiento nos permite abrir longitudinalmente el cordón umbilical, facilitando el aislamiento de las arterias y dejando al descubierto la mayor parte de la gelatina de Wharton. Una vez las arterias han sido aisladas se utilizan nuevamente las pinzas para separar de su capa adventicial los restos de gelatina de Wharton que hayan podido quedar adheridos. Se sujeta la vena de uno de los extremos del cordón con una pinza recta, y se repite la misma maniobra. Nuevamente, se tira de las pinzas hemostáticas en direcciones opuestas, dejando la gelatina libre de vasos [figura 9].

El proceso de obtención de células a partir de la gelatina de Wharton aislada del cordón umbilical se puede subdividir en tres etapas: disgregación mecánica, primera digestión enzimática y segunda digestión enzimática:

1. Disgregación mecánica: Con ayuda de dos cuchillas de bisturí se fragmenta el tejido, obteniendo pequeños explantos de aproximadamente 1 mm³. Estos explantos se recogen con una pipeta tipo Pasteur y se introducen en un tubo

Falcon™ de 50 mL. Con este proceso aseguramos que la superficie del explanto sea lo menor posible, facilitando la extracción de las células del tejido [figura 9].

2. Primera digestión enzimática: La gelatina de Wharton es un tejido compuesto mayoritariamente por matriz extracelular. Por ello, para garantizar un óptimo aislamiento celular es necesario combinar la disgregación mecánica con tratamientos enzimáticos que digieran las proteínas de la matriz extracelular, permitiendo la liberación de las células del tejido en que se encuentran. Tras introducir los explantos dentro del tubo Falcon™, se añaden 10-15 mL de colagenasa tipo I al 0,1% y se incuban a 37 °C en un baño de agitación Unitronic 320 OR (JP Selecta, Barcelona, Spain) durante un periodo de 5 h. Pasado este tiempo, se añaden 30 mL de MEM para diluir la colagenasa, frenando así su actividad. El producto de la digestión se centrifuga a 200 g durante 10 min, tiempo tras el cual se decanta el sobrenadante, dejando el sedimento de tejido listo para la segunda digestión enzimática.
3. Segunda digestión enzimática: Se añade al tubo Falcon™ que contiene el tejido digerido un volumen de 5 mL de tripsina-EDTA 1X, y se incuba a 37 °C en el baño de agitación durante 30 min. Pasado este tiempo, se neutraliza la acción de la enzima añadiendo 20 mL de M199 sin ECGS. Al estar suplementado con FBS, el medio saturará la actividad proteolítica de la tripsina. El producto de la segunda digestión enzimática se centrifuga a 200 g durante 10 min.

Tras la centrifugación se procede a eliminar el sobrenadante mediante aspiración con una pipeta graduada de 10 mL, evitando en todo momento aspirar el sedimento, que ha adquirido una textura muy gelatinosa debido a los procesos de digestión. Este sedimento contiene una mayor parte de tejido digerido que de células en suspensión, por lo que es necesario introducirlo en su totalidad en el frasco de cultivo. El contenido de un tubo Falcon™ de 50 mL se siembra en dos frascos de cultivo de 25 cm² de superficie, a los que se añaden 3 mL de medio AmnioMAX™-C100.

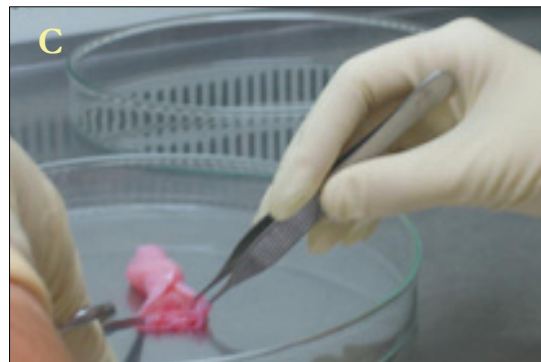
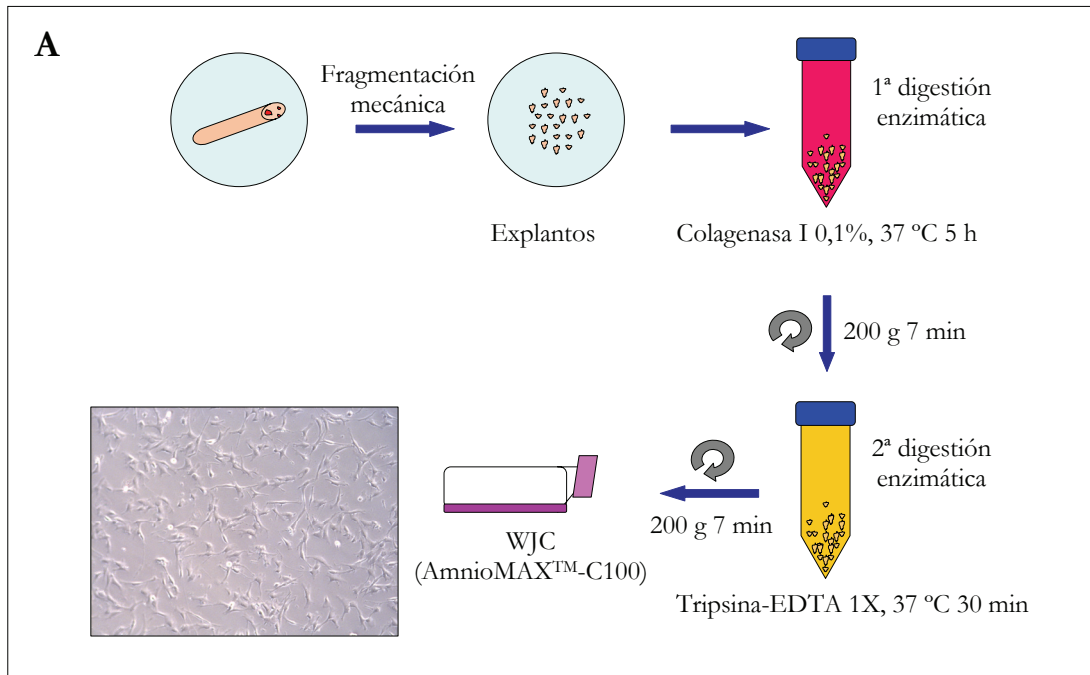


Figura 9: Extracción de células de la gelatina de Wharton, WJC. **(A)** Esquema con el resumen del procedimiento. **(B, C)** Con ayuda de instrumental estéril, se abre longitudinalmente el cordón y se retiran los vasos sanguíneos. **(D, E)** La gelatina aislada se fracciona mediante disgregación mecánica. A continuación, los explantos de tejido se someterán a una doble digestión enzimática.

Los frascos de cultivo se introducen en una estufa de incubación con los mismos parámetros de temperatura, humedad y atmósfera de CO₂ detallados previamente.

3.2.3 Técnicas básicas de cultivo celular

3.2.3.1 Cultivo celular

La suspensión celular obtenida tras el aislamiento de HUVEC y WJC es trasvasada a uno y dos frascos de cultivo de 25 cm² de superficie, respectivamente. A continuación, los cultivos se introducen en una estufa de incubación con parámetros controlados de temperatura, atmósfera de CO₂ y humedad, a fin de aportar a los cultivos un ambiente adecuado para el crecimiento y expansión *in vitro*. Las células se cultivarán bajo estas condiciones desde su aislamiento hasta la finalización del estudio. El seguimiento de los cultivos se lleva a cabo utilizando un microscopio óptico invertido de contraste de fases Zeiss Axiovert 40C (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) dotado de un sistema de imagen digital AxioCam Icc1 (Carl Zeiss).

Pasadas 24 h tras el aislamiento de las HUVEC, se renueva el medio de cultivo (M199) con el fin de eliminar el remanente de colagenasa que pueda quedar disuelta en el medio. Tras este punto, el cambio de medio se realiza cada 48 h hasta que el cultivo entra en situación de semiconfluencia, y las células forman una monocapa que cubre aproximadamente el 80% de la superficie de expansión del frasco.

En el caso de las WJC, el medio de cultivo (AmnioMAX™-C100) no se renueva hasta pasados 7 días tras el aislamiento, tiempo durante el cual las células migrarán desde los restos de gelatina hacia la superficie de expansión del frasco de cultivo. Desde ese momento y hasta alcanzar la semiconfluencia, el medio de cultivo se renueva dos veces por semana.

Para renovar el medio de cultivo, se utiliza una pipeta tipo Pasteur para aspirar todo el contenido del interior de cada frasco de cultivo, siendo muy cuidadosos de no tocar la superficie de expansión celular con el extremo de la pipeta. A continuación, se añade un volumen de 2 mL de la solución HBSS 1X y se lava la superficie de las células, realizando movimientos circulares muy suaves que permitan al tampón difundir por toda la base del frasco. Posteriormente se emplea otra pipeta tipo Pasteur para retirar la solución de lavado y se añade el medio de cultivo correspondiente a cada tipo celular: 4 mL de M199 para los cultivos de HUVEC y 3 mL de AmnioMAX™-C100 para las WJC.

3.2.3.2 Subcultivo celular

Una vez que las células han alcanzado la semiconfluencia en los frascos de cultivo, es necesario llevar a cabo un proceso denominado subcultivo, y que consiste en distribuir el número de células de un frasco de cultivo en dos o más frascos nuevos, permitiendo que las células continúen su crecimiento y expansión *in vitro*.

Los subcultivos se realizan de la misma forma en todas las estirpes celulares estudiadas. Con una pipeta tipo Pasteur se aspira el medio de cultivo, y las células se lavan con 2 mL de HBSS 1X. A continuación, y tras aspirar el tampón, se añaden 1,5 mL de tripsina-EDTA 1X y las células se incuban en una estufa a 37 °C durante 5 min. Durante este tiempo la tripsina-EDTA actúa degradando tanto las proteínas de unión intercelular como las de anclaje al sustrato, levantando así las células de la base del frasco y disgregando la monocapa que éstas habían formado [figura 10]. Para evitar que la enzima continúe degradando proteínas que puedan dañar la estructura y función de las células, al finalizar el tiempo de incubación se añaden 3 mL de medio M199 sin ECGS al cultivo, saturando la actividad proteolítica de la tripsina-EDTA. La suspensión celular obtenida se trasvasa a un tubo Falcon™ de 10 mL y se centrifuga a 200 g durante 7 min.

A continuación, se decanta el sobrenadante y el sedimento celular se resuspende en 1 mL del medio de cultivo correspondiente, distribuyendo las células en proporción 1:2 o 1:3 (en función del número de células viables presentes en el cultivo) y completando el medio de cada frasco hasta un volumen final de 4 mL en el caso de células cultivadas con M199 y 3 mL en los cultivos con AmnioMAX™-C100. Para conocer el número de células viables presentes en el cultivo se realiza una técnica de recuento celular cuyo protocolo se detalla más adelante.

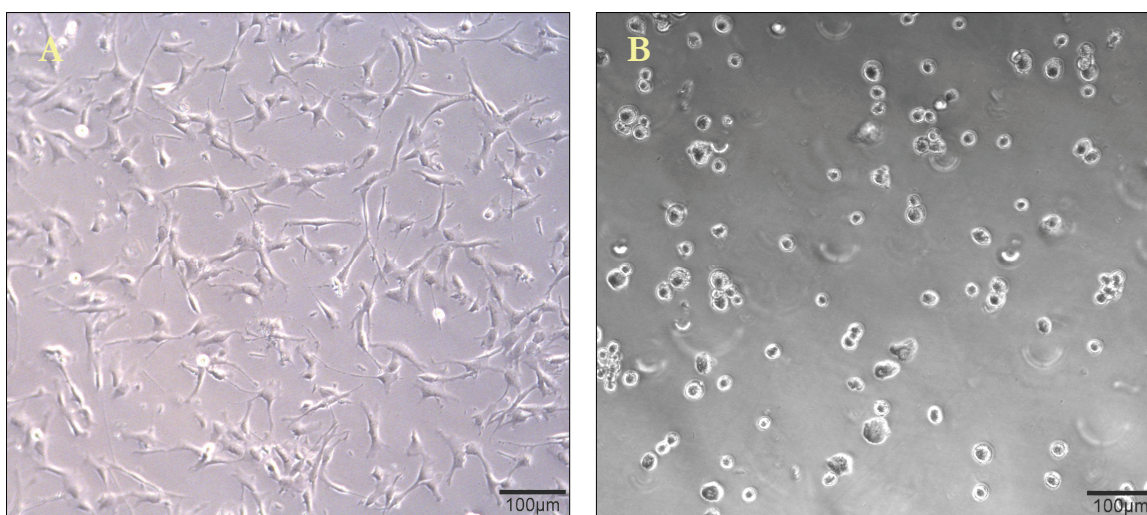


Figura 10: Aspecto de las células en cultivo observadas con un microscopio óptico invertido de contraste de fases. **(A)** Antes de la incubación con tripsina, las células están estiradas y adheridas al frasco de cultivo (100 aumentos). **(B)** La tripsinización provoca el desprendimiento de las células del frasco, y éstas se quedan individualizadas, flotando en el medio de cultivo, y con un aspecto globoso y refringente (100 aumentos).

Las células de las distintas estirpes HUVEC, WJC y Dif-WJC se mantienen en cultivo desde el establecimiento del cultivo primario hasta alcanzar el quinto subcultivo. Tanto en el cultivo primario como en los subcultivos primero, tercero y quinto se toman fracciones celulares que posteriormente se utilizarán en la aplicación de las técnicas descritas en este trabajo.

3.2.3.3 Recuento celular

Durante el subcultivo las células se lavan, se tripsinizan y se centrifugan siguiendo los pasos descritos previamente. Al finalizar la centrifugación, el sedimento celular se resuspende en 1 mL del medio de cultivo correspondiente según la estirpe (M199 para HUVEC y Dif-WJC, AmnioMAX™-C100 para WJC).

Para determinar el número de células viables presentes en el cultivo se toma una alícuota de 20 μL de la suspensión celular y se diluye en 180 μL de una solución de Azul Tripán al 0,2% (Gibco-BRL/Invitrogen), obteniendo una dilución 1/10 de la suspensión celular inicial. El Azul Tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en su membrana. Al analizar las células bajo un microscopio óptico, aquéllas que aparecen teñidas de color azul se considerarán células no viables, siendo las células viables todas las que aparezcan sin teñir y con un aspecto refringente.

Para llevar a cabo la identificación y recuento de las células viables en cada una de las estirpes celulares estudiadas se emplea una cámara de Neubauer sobre la que se coloca un cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm. La cámara de Neubauer está dividida en 9 cuadrículas (3 x 3), y el recuento se realiza sobre las cuatro cuadrículas de los extremos, que a su vez están subdivididas en 16 cuadrículas de menor tamaño (4 x 4) [figura 12]. La concentración de células viables se estima a partir de la media del número de células presentes en estas cuatro cuadrículas, cada una de las cuales tiene una superficie de 1 mm^2 y una profundidad de 0,1 mm. Por tanto, el volumen de suspensión celular comprendido entre cada una de las cuadrículas y el cubreobjetos es de 0,1 mm^3 , es decir, 0,1 μL .

Con ayuda de una pipeta tipo Pasteur se toma un pequeño volumen de la dilución celular en Azul Tripán y se trasvasa a la cámara de Neubauer. Utilizando un

microscopio óptico Zeiss Axioskop (Carl Zeiss) se localizan las cuadrículas de los extremos y se realiza un recuento de las células viables y no viables presentes en dichas zonas, incluyendo en el recuento a aquéllas que estén en contacto con los límites superior e izquierdo de cada cuadrícula, y excluyendo a las células que se encuentren en los límites inferior y derecho [figura 11]. Cada recuento se lleva a cabo por dos observadores independientes, con el fin de minimizar el error en el recuento.

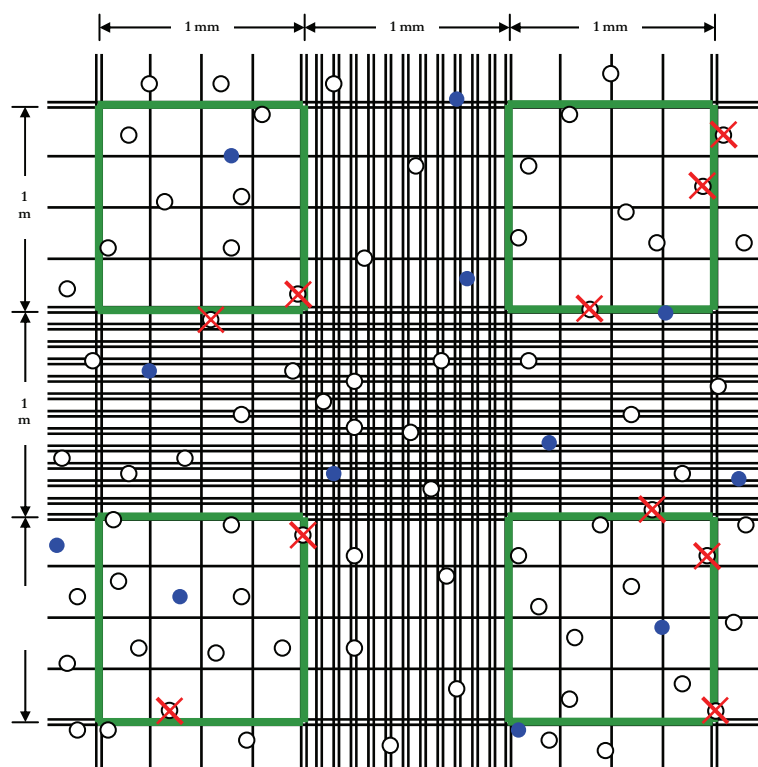


Figura 11: Diagrama representativo de la cámara de Neubauer, con los cuadrantes destinados al recuento celular resaltados en color verde. Para llevar a cabo el recuento de células viables (blancas), se cuentan las células de cada uno de estos cuadrantes, excluyendo a todas las células que se encuentran fuera de ellos, así como a aquéllas que están en contacto con los límites inferior y derecho de cada uno de los cuadrantes. Las células no viables (azul) aparecen teñidas por el Azul Tripán.

Una vez finalizado el recuento, la concentración total de células viables se calcula aplicando la siguiente fórmula matemática:

$$\text{n}^\circ \text{ células viables / mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ medio de células viables}}{\text{cuadrícula de } 0,1 \mu\text{L}} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

Debido a que la suspensión celular se ha diluido en Azul Tripán en proporción 20:180, el valor del factor de dilución correspondiente en este caso es de 10.

Tras determinar el número de células viables/mL, se calcula el número total de células viables presentes en el cultivo. Este dato nos permite homogeneizar el número de células viables empleadas a lo largo de todo el estudio y realizar las curvas de crecimiento, que se detallarán más adelante.

3.2.4 Inducción de la diferenciación de WJC hacia la línea endotelial

Uno de los objetivos de este trabajo consiste en diferenciar mediante un modelo *in vitro* las WJC hacia la línea endotelial, obteniendo una nueva estirpe denominada células de la gelatina de Wharton diferenciadas (Dif-WJC). Para lograr esto, tras el primer subcultivo las WJC son divididas en dos grupos: en uno de ellos las células se mantienen en cultivo utilizando medio Amniomax™-C100, y en el otro el medio es sustituido por M199, estimulando la diferenciación de las células hacia la línea endotelial debido a la presencia en el medio de cultivo de factor de crecimiento endotelial (ECGS).

Las células se mantienen en cultivo hasta alcanzar el quinto subcultivo. En cada uno de estos subcultivos se toman muestras celulares para realizar los distintos estudios de caracterización, viabilidad, proliferación y expresión génica que se detallan más adelante. Los cultivos de HUVEC se utilizarán en todo momento como el grupo control de estos experimentos.

3.2.5 Crecimiento, proliferación y viabilidad celular

Las células de las diferentes estirpes HUVEC, WJC y Dif-WJC se someten a una serie de experimentos *in vitro* con el fin de diseñar curvas de crecimiento para cada estirpe celular, y para evaluar la viabilidad y capacidad proliferativa de estas células en cultivo.

3.2.5.1 Curvas de crecimiento celular

Las curvas de crecimiento son una herramienta útil para cuantificar la capacidad proliferativa de una población celular durante un determinado tiempo en cultivo. El método que se emplea para su diseño se basa en los recuentos celulares mediante el método de exclusión del Azul Tripán, descrito previamente.

Para realizar este ensayo se emplean cultivos de HUVEC, WJC y Dif-WJC del primer subcultivo. Cuando los cultivos están confluentes, las células se tripsinizan, centrifugan y cuentan. Una vez calculado el número de células viables, se siembran por triplicado 8×10^3 células/cm² de cada estirpe celular en placas multipocillo de 12 pocillos (22 mm de diámetro) y se llevan a cabo los recuentos celulares durante 10 días consecutivos, en periodos de 24 h. Los resultados de los recuentos se utilizan para diseñar curvas de crecimiento celular, representando en el eje de ordenadas (Y) el número de células/cm², y en el de abscisas (X) el tiempo expresado en días.

3.2.5.2 Proliferación celular a tiempo real

Los experimentos de proliferación celular a tiempo real (RTCA) se llevan a cabo para analizar la capacidad proliferativa de las tres estirpes celulares HUVEC, WJC y Dif-WJC del primer subcultivo. Para ello, se utiliza un equipo xCELLigence Real Time Cell Analyzer (Roche Applied Science, Basel, Switzerland; AEA Biosciences, San Diego, CA, USA). El xCELLigence es un dispositivo que nos permite evaluar la

proliferación celular en tiempo real mediante la medición de la impedancia (oposición al paso de la corriente eléctrica) que presentan las células en cultivo a lo largo de un determinado tiempo de estudio. El equipo realiza una conversión matemática compleja, transformando los valores de impedancia en un valor adimensional denominado “índice celular”, de manera que a mayor impedancia, mayor índice celular y por tanto mayor actividad proliferativa en el cultivo.

Cuando las células alcanzan la semiconfluencia, son tripsinizadas, centrifugadas y contadas. A continuación se siembran por triplicado 100 μL de la suspensión celular a una concentración de $1,5 \times 10^4$ cel/cm² en una placa de 96 pocillos Microtiter E-Plate (Roche Applied Science) provista de microelectrodos en su superficie basal. Una de las filas de la placa se destina al medio de cultivo carente de células, añadiendo 100 μL de M199 completo en 6 pocillos y AmnioMAX™-C100 en los 6 pocillos restantes. El equipo emplea este medio de cultivo como blanco para la medición de la impedancia.

Una vez sembradas las células, la placa se deja reposar en el interior de la cabina de flujo laminar durante 30 min, permitiendo que las células comiencen a anclarse a la base de los pocillos. Pasado este tiempo, la placa se conecta a un dispositivo que se introduce en el incubador a 37 °C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda, y se incuba durante un periodo de estudio de 100 h. Durante este tiempo y a intervalos de 15 min, el xCELLigence registra datos de la impedancia en cada pocillo, dibujando una gráfica que representa en el eje de ordenadas (Y) el índice celular de cada muestra, y en el de abscisas (X) el tiempo expresado en horas. Los datos obtenidos con esta técnica se analizan con el programa informático RTCA Software 1.1 (Roche Applied Science).

3.2.5.3 Viabilidad celular

Para analizar la viabilidad de las células en cultivo se lleva a cabo un ensayo colorimétrico basado en el método del AlamarBlue® (AbD Serotec, Kidlington,

Oxford, UK). El AlamarBlue® es un colorante vital que contiene un indicador de oxidación-reducción, que presenta la capacidad de virar de color en respuesta a la reducción química de los componentes del medio de cultivo, producida como resultado del crecimiento celular. Utilizando un espectrofotómetro con filtros de longitud de onda adecuada, se puede evaluar cuantitativamente la viabilidad del cultivo celular. Las células analizadas mediante este método corresponden a cultivos de WJC y Dif-WJC del primer, tercer y quinto subcultivo.

Cuando los cultivos están confluentes, las células se tripsinizan, centrifugan y cuentan. A continuación, se siembran por triplicado 90 µL de la suspensión celular a la concentración de $1,5 \times 10^4$ cel/cm² en una placa multipocillo de 96 pocillos (6,4 mm de diámetro), añadiendo también por triplicado 90 µL de medios AmnioMAX™-C100 y M199, que se utilizarán como blanco. A continuación, se añaden 10 µL de AlamarBlue® en cada uno de los pocillos y se mide inmediatamente la absorbancia utilizando un lector de microplaca iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) con longitudes de onda de 570 y 600 nm. Posteriormente se introduce la placa en un incubador a 37 °C con 5% CO₂ y atmósfera húmeda, y se repite la medición con los mismos parámetros a intervalos de 2 h hasta alcanzar las 8 h. Pasado este tiempo la placa se introduce nuevamente en el incubador y se realizan más mediciones a 24, 26, 28, 30 y 48 h.

Para analizar los resultados, se calcula el porcentaje de reducción del AlamarBlue® en cada una de las muestras, utilizando para ello la siguiente fórmula matemática:

$$\% \text{ reducción} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(R1 \times N2) - (R2 \times N1)} \times 100$$

O1 = 80586 (Coef. de extinción molar del AlamarBlue[®] oxidado -azul- a 570 nm)
O2 = 117216 (Coef. de extinción molar del AlamarBlue[®] oxidado -azul- a 600 nm)
R1 = 155677 (Coef. de extinción molar del AlamarBlue[®] reducido -rojo- a 570 nm)
R2 = 14652 (Coef. de extinción molar del AlamarBlue[®] reducido -rojo- a 600 nm)
A1 = Absorbancia de las muestras a 570 nm
A2 = Absorbancia de las muestras a 600 nm
N1 = Absorbancia del blanco a 570 nm
N2 = Absorbancia del blanco a 600 nm

3.2.6 Citometría de flujo

Los ensayos de citometría de flujo llevados a cabo tienen como objetivo evaluar en las estirpes celulares WJC y Dif-WJC la presencia o ausencia de determinadas proteínas relacionadas con la célula mesenquimal. Para ello, hemos utilizado el kit comercial “Human Multipotent mesenchymal stromal cell multi-color flow cytometry kit” -ref. FMC002- (R&D Systems Inc, MN, USA) que contiene 4 anticuerpos para la detección de: CD105 (proteína involucrada en la proliferación y migración celular), CD146 (implicado en las propiedades de multipotencialidad celular), CD90 (intensamente expresado en células madre), y CD45 (proteína de línea hematopoyética) como marcador negativo.

Para llevar a cabo estos ensayos se siguen las instrucciones del fabricante. Antes de comenzar, se rotulan un total de 8 viales de citómetro (BD Becton, Dickinson and company) con el nombre del anticuerpo o el control de isotipo correspondiente, y que se utilizarán más adelante. Los anticuerpos y controles de isotipo están conjugados con moléculas fluorescentes, y se detallan en la tabla 2 [tabla 2]. Las células analizadas mediante esta técnica son: cultivo primario (sólo WJC), primer, tercer y quinto

subcultivo. Para cada uno de los ensayos de citometría de flujo se emplean un total de 2×10^6 células, por lo que éstas se cultivan en frascos de 75 cm^2 que permiten obtener un cultivo confluyente con gran número de células.

Cuando las células alcanzan la confluencia, se tripsinizan, y se trasvasa la suspensión celular de cada frasco de cultivo a un tubo Falcon™ de 50 mL. Las células se centrifugan a 200 g durante 7 min, tiempo tras el cual se decanta el sobrenadante. El sedimento celular obtenido se resuspende en 2 mL de solución comercial “staining buffer” (R&D Systems) y se centrifugan a 300 g durante 5 min. El sobrenadante se decanta nuevamente y el sedimento celular se resuspende en una solución fijadora de PBS 1X que contiene un 1% (v/v) de albúmina de suero bovino (BSA) y un 1% (v/v) de FBS. A continuación, se toma una alícuota de 20 μL de la suspensión celular y se realiza un recuento del número de células viables. Tras calcular el número total de células viables, con ayuda de la micropipeta se toma un volumen que contenga aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células, y se trasvasa a un vial de citómetro (BD Becton, Dickinson and company). Esta operación se repite varias veces, hasta completar los ocho viales. A continuación, se añade a cada vial un volumen de 10 μL del anticuerpo o control de isotipo correspondiente, resuspendiendo cuidadosamente para no formar espuma. Los viales se cubren con papel de aluminio y se incuban en oscuridad durante 45 min refrigerados a 4 °C.

Pasado este tiempo, se añaden 2 mL de “staining buffer” a cada vial, y se centrifugan a 300 g durante 5 min. Posteriormente se elimina el sobrenadante, las células se resuspenden nuevamente en 300 μL de “staining buffer” y son inmediatamente analizadas mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton, Dickinson and company) con un láser de argón a 488 nm de longitud de onda de excitación y filtros de emisión apropiados para las distintas moléculas fluorescentes enunciadas previamente.

Anticuerpo / Control de isotipo	Clon	Molécula fluorescente
Mouse IgG1 anti-CD105	166707	PerCP (conjugado de la proteína clorofil peridina)
Mouse IgG1 control de isotipo	11711	PerCP
Mouse IgG1 anti-CD146	128018	CFS (carboxifluoresceína)
Mouse IgG1 control de isotipo	11711	CFS
Mouse IgG2A anti-CD90	Thy-1A1	APC (aloficocianina)
Mouse IgG2A control de isotipo	20102	APC
Mouse IgG1 anti-CD45	2D1	PE (ficoeritrina)
Mouse IgG1 control de isotipo	11711	PE

Tabla 2: Listado de los anticuerpos, controles de isotipo y conjugados fluorescentes empleados en los ensayos de citometría de flujo.

3.2.7 Análisis de la expresión génica

3.2.7.1 Extracción de RNA

La fracción de RNA total se las células HUVEC, WJC y Dif-WJC en los distintos subcultivos se obtiene a partir de frascos de 25 cm² confluentes, y se lleva a cabo siguiendo el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987). Tras aspirar el medio de cultivo, las células se lavan con 2 mL de HBSS 1X y posteriormente con 2 mL de PBS 1X estéril. Una vez lavadas, las células se lisan añadiendo a cada frasco 1 mL de TRIzol® (Gibco-BRL/Invitrogen), producto compuesto de fenol e isotiocianato de guanidina que actúa manteniendo la integridad del RNA al tiempo que lisa las células y disuelve los componentes celulares. El producto resultante de la lisis celular se recoge en un tubo Eppendorf de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany) debidamente identificado y se almacena congelado a -80 °C hasta su utilización, una vez se hayan recogido todas las muestras necesarias para la realización del estudio.

Llegado ese momento, las muestras se descongelan y se centrifugan a 12.000 g durante 10 min a 4 °C utilizando una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810 R (Eppendorf). A continuación el sobrenadante se trasvasa a tubos Eppendorf de 1,5 mL limpios y el pellet, que contiene los restos celulares de mayor tamaño, se descarta. El sobrenadante se deja en reposo a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. Pasado este tiempo se añaden 200 μ L de cloroformo frío (-20 °C) y se mantienen los tubos en agitación durante 10-15 min a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugan a 14.000 g durante 15 min a 4 °C, tiempo tras el cual se pueden observar tres fases en el interior de cada tubo: la fase inferior, de mayor densidad, es de color rosáceo y contiene proteínas y los restos celulares de menor tamaño que no se eliminaron tras la primera centrifugación; la fase intermedia, blanquecina, está formada por DNA y la fase superior, de menor densidad y aspecto acuoso, contiene el RNA total [figura 12].

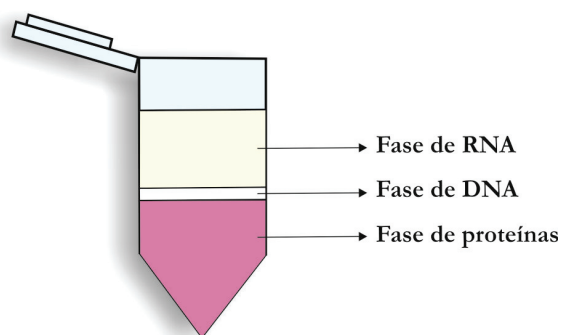


Figura 12: Esquema de la separación de las fases de RNA, DNA y proteínas que se obtienen tras la adición de cloroformo frío y posterior agitación y centrifugación.

Muy delicadamente y con ayuda de una micropipeta, se trasvasa la fase acuosa de cada muestra a tubos Eppendorf de 1,5 mL limpios, teniendo especial cuidado de no arrastrar ninguna fracción de la interfase, y pasando inmediatamente el RNA a una cubeta con hielo. A continuación se añaden 500 μ L de isopropanol frío (-20 °C), se

agitan suavemente por inversión de los tubos y se incuban a 4 °C durante toda la noche, permitiendo que el RNA de cada muestra precipite al fondo del tubo.

Al día siguiente, las muestras se centrifugan a 12.000 g durante 20 min a 4 °C, pudiendo observar a continuación el RNA precipitado como un sedimento blanquecino. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se lava con 1 mL de etanol de 70° frío (-20 °C), centrifugando a 12.000 g durante 15 min a 4°C. El etanol se elimina por decantación y se repite el proceso de lavado, añadiendo en esta ocasión 500 µL de etanol frío. Terminados los dos lavados, el RNA se mantiene a temperatura ambiente durante un tiempo no superior a 5 min para permitir la total evaporación de los restos de alcohol, pasando inmediatamente después los tubos al hielo. Finalmente, el RNA se rehidrata con 20-25 µL de agua libre de desoxirribonucleasas (DNasas) y ribonucleasas (RNasas) (Gibco-BRL/Invitrogen), resuspendiendo el sedimento en el agua hasta su total disolución.

Mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) se cuantifica la concentración total de RNA en cada muestra midiendo la absorbancia a 260 nm, y se verifica su calidad midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm, calculando a continuación la relación abs 260/abs 280, que ha de dar un valor próximo a 2.

Una vez cuantificada la concentración total de RNA en cada muestra, se prepara una batería de muestras a concentración 50 ng/µL, que será la concentración de partida en todos los experimentos. Aquellas muestras cuya concentración sea inferior a 50 ng/µL serán descartadas del estudio.

3.2.7.2 Transcripción inversa

Para sintetizar el DNA complementario (cDNA) mediante transcripción inversa (RT) se parte de la batería de muestras de RNA a concentración 50 ng/ μ L obtenida tras el aislamiento de RNA. En tubos Eppendorf de 0,5 mL estériles, se mezclan 4 μ L de cada muestra con 4 μ L de solución oligo-dT(15) 0,25 μ g/ μ L (Gibco-BRL/Invitrogen), y se calientan a 65 °C durante 10 min utilizando un baño seco AccuBlock™ Digital Dry Bath (LabNet International Inc, Edison, NJ, USA), con el fin de desnaturalizar el RNA. Pasado este tiempo, las muestras se pasan inmediatamente al hielo y se añaden 10 μ L de una mezcla de retrotranscripción que contiene los siguientes productos:

- 2,8 μ L de tampón de reacción 5X (Tris-HCl 250 mM y pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM)
- 2 μ L de desoxirribonucleótidos trifosfato 10 mM (dNTP)
- 2 μ L de ditioneitol 0,1 M (DTT)
- 1,7 μ L de agua libre de DNasas y RNasas
- 0,5 μ L de inhibidor de RNasas (RNasa Out)
- 1 μ L de enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV)

El proceso de RT se lleva a cabo mediante el uso de un termociclador Programmable Thermal Block II (Lab Line Instruments, Maharashtra, India). El RNA desnaturalizado se somete a un ciclo de síntesis de cDNA al calentarlo a 37 °C durante 1 h y 15 min. A continuación se eleva la temperatura a 70 °C durante 15 min para desnaturalizar la enzima, y se disminuye gradualmente la temperatura hasta los 4 °C. El cDNA producido tras la RT se diluye a razón de 1:20 utilizando agua libre de DNasas y RNasas y se almacena a -20 °C hasta su utilización. Paralelamente, con el fin de descartar la existencia de contaminación por DNA genómico, se realiza una RT negativa en la que la enzima MMLV se sustituye por agua libre de DNasas y RNasas.

3.2.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

La qRT-PCR se realiza con el fin de amplificar y cuantificar la secuencia de interés de los diferentes genes estudiados. Para normalizar los resultados, se emplea el gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), repitiendo todos los ensayos un total de tres veces. Tanto los genes analizados como las secuencias de sus cebadores se detallan en la tabla 3 [tabla 3].

Para llevar a cabo la qRT-PCR, se toma un volumen de 5 μL de cada muestra de cDNA diluido 1:20 y se trasvasa por triplicado a pocillos de una placa de 96 pocillos MicroAmp Fast 96-well Tray (Applied Biosystems). A continuación se añade en cada pocillo 15 μL de una mezcla que contiene:

- 10 μL de enzima iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories)
- 1 μL de cebador sentido 6 μM
- 1 μL de cebador antisentido 6 μM
- 3 μL de agua libre de DNAsas y RNAsas

La reacción de qRT-PCR se lleva a cabo en un equipo StepOne Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) configurado con las siguientes condiciones: una primera etapa de activación de la enzima (95 °C, 10 min), seguida de una repetición de 40 ciclos de las siguientes etapas: desnaturalización (95 °C, 15 sg), anillamiento de los cebadores (temperatura variable en función de la temperatura de fusión $-T_m-$ de cada par de cebadores [tabla 3], 30 sg) y elongación (72 °C, 1 min). Para finalizar, una etapa de desnaturalización de la enzima y conservación del producto (95 °C, 15 sg + 60 °C, 1 min + 95 °C, 15 sg + 60 °C 15 sg) [figura 13]. La detección de la fluorescencia se realiza al final de cada uno de los ciclos de repetición. Al terminar el experimento, el dato

cuantitativo correspondiente a la expresión génica de cada muestra se normaliza con la expresión del gen de referencia GAPDH.

Para comprobar la presencia de un único producto de qRT-PCR se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2%, diluyendo 2 gr de agarosa SeaKem® GTG® Agarose (Cambrex, Rockland, ME, USA) en 100 mL tampón TBE 1X, que contiene 7 µL de SYBR Green II RNA Gel Stain (Gibco-BRL/Invitrogen). Se añade a cada muestra 2 µL del tampón de carga BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Gibco-BRL/Invitrogen) que contiene azul de bromofenol. La electroforesis se lleva a cabo a 80 V durante aproximadamente 45 min. La observación de las bandas se realiza con un equipo Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories).

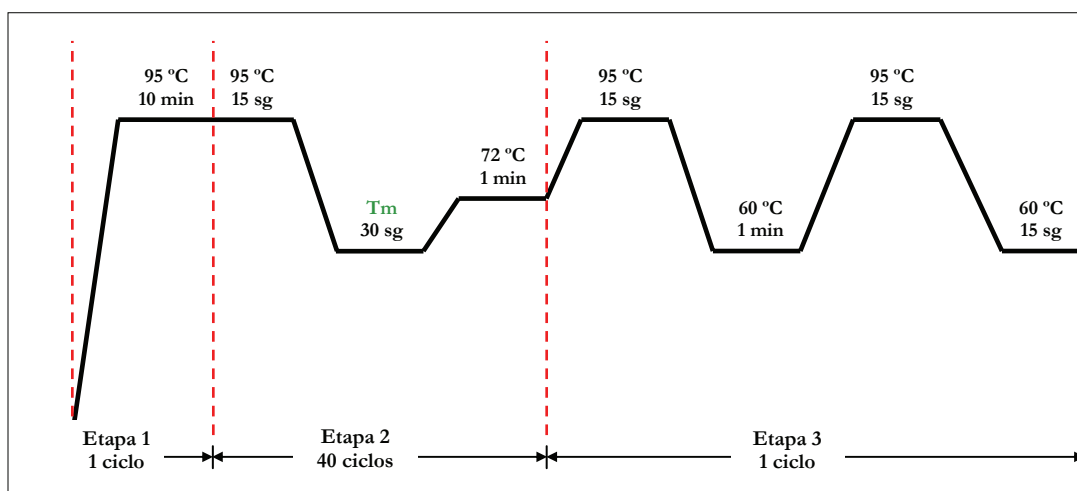


Figura 13: Diagrama representativo de las etapas de la qRT-PCR. Los procesos de desnaturalización, anillamiento de los cebadores y elongación se suceden durante los 40 ciclos de repetición de la etapa 2. La “ T_m ” es específica para cada par de cebadores, y determina la temperatura de anillamiento.

Gen constitutivo			
Gen	Secuencia cebador sentido 5'→3'	Secuencia cebador antisentido 5'→3'	Tm
GAPDH	GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA	GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T	60 °C

Factores de transcripción relacionados con la célula embrionaria			
Gen	Secuencia cebador sentido 5'→3'	Secuencia cebador antisentido 5'→3'	Tm
Nanog	ATG CCT CAC ACG GAG ACT GT	AAG TGG GTT GTT TGC CTT TG	60 °C
Oct-4	GGT GGA GAG CAA CTC CAA TG	TCT GCA GAG CTT TGA TGT CC	60 °C
SOX2	CTC CGG GAC ATG ATC AGC	GGT AGT GCT GGG ACA TGT GAA	60 °C

Genes de función endotelial			
Gen	Secuencia cebador sentido 5'→3'	Secuencia cebador antisentido 5'→3'	Tm
CD31	ACT GCA CAG CCT TCA ACA GA	TTT CTT CCA TGG GGC AAG	60 °C
CD34	TCC AGA AAC GGC CAT TCA G	CCC CAC CTA GCC GAG TCA	60 °C
vWF	GTC GAG CTG CAC AGT GAC AT	CCA CGT AAG GAA CAG AGA CCA	60 °C
eNOS	AAG AGG AAG GAG TCC AGT AAC ACA GA	ACG AGC AAA GGC GCA GAA	60 °C

Genes implicados en angiogénesis			
Gen	Secuencia cebador sentido 5'→3'	Secuencia cebador antisentido 5'→3'	Tm
VEGF	ATG ACG AGG GCC TGG AGT GTG	CCT ATG TGC TGG CCT TGG TGA G	60 °C
Flt-1	TCAGCTACTGGGACACCGG	CCTGAAC TAGATCCTGTGAGAAGCA	60 °C
KDR	TCCTGTATGGAGGAGGAGGA	CGGCTCTTTCGCTTACTGTT	60 °C

Tabla 3: Relación de los genes estudiados mediante qRT-PCR.

3.2.8 Determinación de los niveles de prostaciclina

Los niveles de prostaciclina presentes en el medio de cultivo se determinan por medición de los niveles de 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$, un intermediario de la ruta metabólica de la prostaciclina. Para ello se llevan a cabo ensayos de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) para detectar los niveles de este metabolito en el medio de cultivo de las tres estirpes celulares HUVEC, WJC y Dif-WJC durante los subcultivos primero, tercero y quinto.

Cuando las células se encuentran en semiconfluencia, los cultivos se tripsinizan, centrifugan y cuentan. A continuación se siembran por duplicado 30.000 cel/cm² en un pocillo de una placa multipocillo de 6 pocillos (35 mm de diámetro) y se cultivan en el incubador a 37 °C, 5% de CO₂ y humedad durante 24 h. Pasado este tiempo se retira el medio de cultivo, se lava con HBSS 1X y se añade a cada pocillo 1 mL de medio DMEM deprivado de FBS. Las células se cultivan nuevamente en el incubador durante 24 h, tiempo tras el cual se recoge el medio en tubos Eppendorf de 1,5 mL que se almacenan congelados a -80 °C hasta recolectar todas las muestras.

El ensayo de ELISA se lleva a cabo utilizando el kit comercial “human 6-keto-prostaglandin- $F_{1\alpha}$ Enzyme immunoassay kit” -ref. ADI-900-004- (Assay Designs, Enzo Life Sciences, Lausen Switzerland), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit contiene una placa multipocillo de 96 pocillos impregnada con el anticuerpo anti-IgG, y los reactivos necesarios para el ensayo. El experimento se diseña de tal modo que tanto las muestras como los estándares se analicen por duplicado.

Este kit emplea un anticuerpo policlonal contra 6-keto-prostaglandina- $F_{1\alpha}$ con el fin de unirlo de manera competitiva a los estándares, las muestras a analizar, y a una molécula de fosfatasa alcalina que está unida covalentemente a la 6-keto-prostaglandina-

F_{1α}. La concentración de esta molécula en los diferentes estándares se encuentra comprendida entre 50.000 y 76 pg/mL.

Tras añadir en los pocillos correspondientes 100 μL de los estándares, 100 μL de las muestras y 50 μL de los reactivos, se realiza una incubación de 2 h a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se elimina el exceso de reactivo y la placa se lava con un tampón de lavado. A continuación se añade en los pocillos correspondientes 200 μL del sustrato pNpp (p-nitrofenil fosfato) y 5 μL del conjugado de 6-keto-prostaglandina-F_{1α} con fosfatasa alcalina. La placa se incuba durante 45 min a temperatura ambiente y se detiene rápidamente la reacción añadiendo 50 μL de la solución de frenado que contiene fosfato trisódico, obteniéndose una tonalidad amarilla en los pocillos cuya absorbancia se analiza mediante un lector de microplaca iMark Microplate Absorbance Reader a 405 nm. La intensidad del color amarillo es inversamente proporcional a la concentración de metabolito presente en los estándares y las muestras.

Los resultados se analizan mediante el programa informático Microplate Manager 6 (Bio-Rad Laboratories). Para obtener la concentración de 6-keto-prostaglandina-F_{1α} se realiza un ajuste de 4-parámetros a partir de los datos de absorbancia obtenidos en los diferentes estándares, y se interpolan los valores individuales de absorbancia para cada una de las muestras ensayadas.

3.2.9 Evaluación de la actividad telomerasa

El análisis de la actividad telomerasa en células en cultivo se utiliza frecuentemente como un marcador de senescencia celular. Por este motivo, llevamos a cabo la evaluación de la actividad telomerasa en cultivos de WJC y Dif-WJC del primer, tercer y quinto subcultivo. Utilizamos el kit comercial “TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS}” -ref. 12.013.789.001- (Roche Applied Science) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit contiene todos los reactivos necesarios para desarrollar este

análisis, y combina una reacción de PCR con una técnica de ELISA para obtener valores cuantitativos de la actividad telomerasa en cada cultivo: la PCR amplifica las repeticiones teloméricas presentes en cada muestra, que serán cuantificadas posteriormente mediante un ensayo de ELISA.

Para llevar a cabo esta técnica es necesario realizar lisados celulares de cada cultivo que se quiera estudiar. Para ello, las células se tripsinizan, centrifugan y cuentan. Se trasvasa a un tubo Eppendorf de 1,5 mL un volumen que contenga 200.000 células y se centrifuga a 3.000 g durante 5 min a 4 °C. El pellet celular obtenido se resuspende en PBS 1X estéril y se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones. Tras retirar el PBS, se resuspenden las células en 200 µL de reactivo de lisis, y se incuban en el interior de una cubeta con hielo durante 30 min. El lisado celular se centrifuga entonces a 16.000 g durante 20 min a 4 °C, y se trasvasa el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo, con mucho cuidado de no arrastrar ningún resto del sedimento. Los lisados celulares se almacenan a -80 °C hasta haber recolectado todas las muestras.

Una pequeña alícuota de cada lisado celular se incuba a 85 °C durante 15 min con el fin de inactivar la actividad enzimática de la telomerasa. Estas muestras inactivadas se utilizarán más adelante como control negativo para cada muestra objeto de estudio.

Para llevar a cabo la PCR, se trasvasan de forma independiente 3 µL de cada muestra y control negativo a dos tubos Eppendorf de 0,2 mL. Además de las muestras, se incluyen dos tubos que contienen una solución control, y reactivo de lisis, respectivamente. La solución control constituye el control positivo, y el reactivo de lisis el blanco. A cada uno de estos tubos se añade una solución maestra compuesta por 25 µL de mezcla de reacción y 5 µL de estándar interno. Los tubos se agitan y se introducen en un termociclador Programmable Thermal Block II, con los siguientes parámetros: Una etapa de elongación de los cebadores (30 min, 25 °C) seguido de un paso destinado a la inactivación de la telomerasa (5 min, 94 °C), 30 ciclos de

amplificación -desnaturalización (30 sg, 94 °C), anillamiento (30 sg, 50 °C) y polimerización (90 sg, 72 °C)-, y un paso final de desnaturalización y conservación del producto (10 min, 72 °C).

Para el ELISA, se trasvasan 2,5 µL del producto de amplificación de la PCR a dos tubos Eppendorf independientes que contienen 10 µL de reactivo de desnaturalización. A cada uno de estos tubos se le añaden 100 µL de un tampón de hibridación, T o IS. Tras mezclar todo el volumen, se trasvasan 100 µL de cada tubo a un pocillo de la placa de 96 pocillos impregnada con estreptavidina, y se incuba en agitación durante 2 h a 37 °C. Pasado este tiempo, se vacían los pocillos y se lavan 3 veces con una solución de lavado.

Finalizado éste, se añade a cada pocillo 100 µL de la solución anti-DIG-HRP a concentración 10 mU/mL y se incuba en agitación durante 30 min a 25 °C. Se lava nuevamente la placa un total de 5 veces y se añaden 100 µL de solución sustrato TMB, incubando la placa en agitación durante 10-20 min a 25 °C. Pasado este tiempo, se detiene la reacción al añadir 100 µL de solución de frenado, y se lee inmediatamente la absorbancia de las muestras en un lector de microplaca iMark Microplate Absorbance Reader a 450 nm, con una longitud de onda de referencia de aproximadamente 690 nm.

El análisis de los resultados de la actividad telomerasa relativa (ATR) en cada muestra, se realiza mediante el cálculo de la diferencia entre las absorbancias medidas a 450 y 690 nm, y se aplica para ello la siguiente fórmula matemática:

$$\text{ATR} = \frac{(M_T - M_{0T}) / M_{IS}}{(CP_T - B_T) / CP_{IS}} \times 100$$

M_T = Muestra con tampón de hibridación T

M_{IS} = Muestra con tampón de hibridación IS

$M0_T$ = Muestra inactivada (control negativo) con tampón de hibridación T

CP_T = Control positivo (solución control) con tampón de hibridación T

CP_{IS} = Control positivo (solución control) con tampón de hibridación IS

B_T = Blanco (reactivo de lisis) con de hibridación T

Se considera que una muestra tiene actividad telomerasa positiva cuando el cálculo $(M_T - M0_T)$ da como resultado un valor al menos dos veces mayor que el de $M0_T$.

Para confirmar la veracidad de los datos obtenidos es fundamental comprobar que el valor de las muestras inactivadas por calor sea inferior a 0,1. Además, los valores correspondientes al cálculo $(CP_T - B_T) / CP_{IS}$ deben encontrarse en un rango comprendido entre 0,2 y 0,5.

3.2.10 Estudios histológicos

Para llevar a cabo el análisis histológico del cordón umbilical, se recoge una pequeña sección de 1 cm de espesor de cada cordón, y se sumerge en la solución fijadora F13 (solución acuosa que contiene un 60% de etanol, 20% de metanol y 7% de politetilenglicol 300), manteniendo las muestras en fijación a 4 °C durante una semana. Transcurrido este tiempo, el tejido se lava con agua destilada y se deshidrata con incubaciones seriadas de 20 a 40 min en alcoholes de gradación ascendente (70°, 96°, y 100°) y se procede a realizar la inclusión en parafina: el tejido deshidratado se incuba en una dilución 1:1 de alcohol 100° y acetato n-butilo (15 min), a continuación se incuba con acetato n-butilo (20 min), con una dilución 1:1 de acetato n-butilo y parafina (20 min a 60 °C), y finalmente se sumergen las muestras en parafina líquida (5 h a 60 °C).

Al finalizar la inclusión, se confeccionan los bloques de parafina mediante el uso de barras de Leuckart, vertiendo parafina fundida a 60° C en su interior, e introduciendo a continuación las muestras correctamente orientadas. Una vez solidificada la parafina, se emplea un microtomo rotatorio Microm HM-325 (Thermo Fisher Scientific) para realizar cortes seriados de 5 µm de espesor, que se estiran en un baño de agua caliente Termofin (JP Selecta) y se recogen en portaobjetos de vidrio que han sido previamente impregnados con una solución de poli-lisina al 10% para facilitar la adhesión de los cortes.

Una vez secos, los cortes se desparafinan por inmersión en xilol (30 min), se rehidratan realizando incubaciones de 5 min en alcoholes de gradación descendente (100°, 96°, 70°) y se hidratan completamente con agua destilada. A continuación, las secciones de tejido se tiñen con las técnicas de tinción de hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson (variante de Goldner-Gabe) y rojo Sirio. Las tinciones se visualizan con un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). En el caso de las muestras teñidas con rojo Sirio, se precisa del uso de luz polarizada en el microscopio.

3.2.10.1 Hematoxilina-eosina (HE)

Tinción con hematoxilina de Carazzi (15 min)

Lavado con agua corriente para el viraje de la hematoxilina (10 min)

Tinción con eosina alcohólica (3 min)

Lavado con agua

Deshidratación con alcohol de 96° (5 min)

Deshidratación con alcohol de 100° (5 min)

Aclaramiento con xilol (10 min)

Montaje con bálsamo de Canadá

3.2.10.2 Tricrómico de Masson (TM)

Tinción con hematoxilina de Carazzi (15 min)
Lavado con agua corriente para el viraje de la hematoxilina (10 min)
Tinción con fucsina (10 min)
Lavado rápido con agua acética al 1% (5 sg)
Tinción con orange G (10 min)
Lavado rápido con agua acética al 1% (5 sg)
Tinción con verde luz (10 min)
Lavado con agua y unas gotas de alcohol de 96°
Deshidratación con alcohol de 96° (5 min)
Deshidratación con alcohol de 100° (5 min)
Aclaramiento con xilol (10 min)
Montaje con bálsamo de Canadá

3.2.10.3 Rojo Sirio (RS)

Tinción con rojo Sirio (30 min)
Lavado con ácido clorhídrico 0,01 N (10 min)
Tinción con hematoxilina de Weigert (10 min)
Lavado con agua corriente para el viraje de la hematoxilina (10 min)
Deshidratación rápida en alcohol al 100% (5 sg)
Aclaramiento con xilol (10 min)
Montaje con bálsamo de Canadá

3.2.11 Estudios de inmunofluorescencia

Para llevar a cabo los estudios de inmunofluorescencia se utilizan muestras de HUVEC, WJC y Dif-WJC de los diferentes subcultivos seleccionados. Una vez el cultivo ha alcanzado la semiconfluencia, las células se tripsinizan, se centrifugan y se

cuentan. Alícuotas de 3×10^5 células se siembran en cubreobjetos estériles de vidrio de 12 mm de diámetro y se mantienen en cultivo durante 24 h, tiempo tras el cual las células se fijan utilizando para ello una solución de paraformaldehído al 4% (pH=7,4) durante 10 min. A continuación, las células se lavan con PBS 1X estéril y se almacenan a 4 °C hasta su utilización.

Empleamos técnicas de inmunofluorescencia, en las que la detección de la reacción antígeno-anticuerpo se realiza por un anticuerpo secundario unido a una molécula fluorescente. Los anticuerpos, así como las diluciones empleadas en cada caso se detallan en las siguientes tablas [tablas 4 y 5].

En primer lugar, las muestras seleccionadas se lavan con PBS 1X a pH=7,4 y se incuban con un tampón de bloqueo y permeabilización que contiene Tritón X-100 al 0,1%, BSA al 1% y FBS al 10% diluidos en PBS 1X. Esta incubación se mantiene durante 45 min a temperatura ambiente, y permite permeabilizar las membranas celulares y bloquear las zonas de unión inespecífica del anticuerpo.

Pasado este tiempo, se añade a cada muestra el anticuerpo primario correspondiente diluido en una mezcla de FBS al 10% y BSA al 1% a la concentración adecuada [tabla 4], y las muestras se incuban durante toda la noche a 4 °C. En todos los casos, se utiliza como control negativo el mismo tipo celular al que no se le añade anticuerpo primario, siendo éste sustituido por una dilución de FBS 10% y BSA 1% en PBS.

Al día siguiente, tras atemperar las muestras, se procede al lavado con PBS para eliminar los restos de anticuerpo. A continuación se añade el anticuerpo secundario (conjugado con una molécula fluorescente) correspondiente en cada caso, diluido en PBS a la concentración adecuada [tabla 5], y se incuban durante 1 h a 37 °C en oscuridad. Pasado este tiempo, las muestras se lavan con PBS y los núcleos celulares se contrastan con el colorante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindol -DAPI- (Merck

KGaA, Darmstadt, Germany) a concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incubando las muestras durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se lavan con PBS y se montan con el medio de montaje Calbiochem® FluorSave™ Reagent (Merck).

Anticuerpos específicos de la línea endotelial				
Anticuerpo	Clon	Especificidad	Dilución	Proveedor
CD31 (PECAM-1)	WM-59 Monoclonal	Proteína transmembrana implicada en la unión entre células endoteliales y entre células endoteliales y linfocitos.	1:100	Sigma (P8590)
CD34	QBEND10 Monoclonal	Glicoproteína transmembrana localizada en células las endoteliales y las células precursoras del sistema hematopoyético.	1:50	Abcam (ab8536)
vWf	---- Policlonal	Factor de coagulación presente en el citoplasma de las células endoteliales	1:200	Sigma (F3520)

Anticuerpos relacionados con procesos angiogénicos				
Anticuerpo	Clon	Especificidad	Dilución	Proveedor
Flt-1 (VEGFR-1)	Y103 Monoclonal	Receptor 1 del VEGF. Modula la vía de señalización de KDR.	1:250	Abcam (ab32152)
KDR (VEGFR-2)	---- Monoclonal	Receptor 2 del VEGF. Modula la mayoría de las respuestas celulares al VEGF.	1:200	Abcam (ab9530)

Anticuerpos del citoesqueleto				
Anticuerpo	Clon	Especificidad	Dilución	Proveedor
α-actina	1A4 Monoclonal	Proteína implicada en organización del citoplasma, citocinesis y movilidad.	1:100	Sigma (A2547)
α-tubulina	---- Monoclonal	Proteína estructural de los microtúbulos. Elementos móviles en mitosis.	1:50	Sigma (T6199)
Desmina	DE-U-10 Monoclonal	Filamentos intermedios, predominantes en células musculares.	1:200	Sigma (D1033)
Vimentina	V9 Monoclonal	Filamentos intermedios presentes en todas las estirpes celulares.	1:250	Sigma (V6630)

Anticuerpos de célula mesenquimal				
Anticuerpo	Clon	Especificidad	Dilución	Proveedor
CD9	209306 Monoclonal	Proteína de membrana implicada en adhesión celular y activación plaquetar	1:10	R&D Systems (kit SC009)
E-cadherina	180224 Monoclonal	Proteína de adhesión celular implicada en migración y proliferación celular.	1:10	R&D Systems (kit SC009)
PODXL	222328 Monoclonal	Proteína citoplasmática implicada en la regulación de la adhesión celular.	1:10	R&D Systems (kit SC009)
Oct-4	962649 Policlonal	Factor de transcripción relacionado con la pluri/multipotencialidad de las células.	1:10	R&D Systems (kit SC009)

Tabla 4: Relación de los anticuerpos primarios empleados en los estudios de inmunofluorescencia.

Anticuerpos secundarios conjugados				
Anticuerpo	Clon	Molécula conjugada	Dilución	Proveedor
Donkey anti-goat IgG	---- Policlonal	Rojo de rodamina	1:200	Jackson IR (705026147)
Donkey anti-mouse IgG	---- Policlonal	Rojo de rodamina	1:300	Jackson IR (715295150)
Goat anti-mouse IgG	---- Policlonal	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	1:100	Sigma (F2012)
Goat anti-rabbit IgG	---- Policlonal	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	1:200	Abcam (ab6717)

Tabla 5: Relación de los anticuerpos secundarios empleados en los estudios de inmunofluorescencia.

Las células se examinan con un microscopio láser confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, GmbH Wetzlar, Germany). La cantidad de células positivas para un marcador determinado se realiza mediante el recuento en 40 campos elegidos al azar (a 200 aumentos) y se expresa como el porcentaje de células marcadas con respecto al número de células totales.

3.2.12 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La microscopía electrónica de transmisión (MET) se emplea para analizar la ultraestructura de HUVEC, WJC y Dif-WJC del primer y tercer subcultivo. Cuando las células alcanzan la semiconfluencia, los cultivos se tripsinizan y centrifugan. Los sedimentos celulares obtenidos se recogen suavemente con una pipeta tipo Pasteur de vidrio y se introducen en tubos Eppendorf de 1,5 mL estériles que contienen 1 mL de líquido fijador glutaraldehído al 3%, y se almacenan refrigeradas a 4 °C durante 2 h. A continuación, las células se lavan y conservan refrigeradas a 4 °C hasta su utilización inmersas en tampón Milloning, solución acuosa que contiene: fosfato monosódico - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - a concentración 2,26%, hidróxido sódico - NaOH - a concentración 2,52% y glucosa anhidra - $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ - a concentración 5,4%.

Una vez recolectadas todas las muestras, se comienza el procesamiento de las mismas. El primer paso de este procesamiento es una inclusión en araldita, proceso que tiene tres días de duración y que se realiza con la siguiente metodología:

1. Primer día: Se realiza una postfijación con tetraóxido de osmio al 1% en tampón Milloning con calcio (1 h) y un lavado con agua destilada. A continuación se inicia la deshidratación de las muestras mediante incubaciones de 15 a 30 min con acetonas de concentración ascendente (30%, 50%, 70%). Las muestras se incuban a 4 °C durante toda la noche con una dilución de acetona al 70% y acetato de uranilo.
2. Segundo día: Se continúa la deshidratación con acetonas (90%, 100%), y las muestras se incuban durante 40 min con una dilución de acetona al 100% y sulfato de cobre. A continuación se inicia el proceso de inclusión en una resina sintética llamada araldita: para ello se lleva a cabo una incubación inicial en óxido de propileno (40 min) y a continuación las muestras se incuban (entre 30 min y 2 h) en diluciones de óxido de propileno y araldita I en distintas proporciones (3:1,

2:2, 1:3). Las muestras se incuban a 40 °C durante toda la noche sumergidas en araldita I.

3. Tercer día: La inclusión de las muestras finaliza con una última incubación con araldita I y tres incubaciones consecutivas (entre 30 min y 1 h) con araldita II a 40 °C. A continuación, se llenan moldes con araldita II y se orientan las piezas en su interior. Finalmente, los moldes se incuban durante 2 días a 70 °C para permitir la polimerización de la araldita II.

Una vez polimerizados, los bloques se desmoldan, y utilizando un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert Microscope Services, NY, USA) se realizan cortes semifinos de 1 μm de espesor. A continuación se tiñen con azul de toluidina y se visualizan bajo el microscopio óptico. Tras establecer la zona de interés de estudio para cada muestra, se utiliza el ultramicrotomo para obtener cortes ultrafinos de 60 nm de espesor. Los cortes se recogen en rejillas de cobre cubiertas con una membrana de resina Formvar y se contrastan con citrato de plomo durante 4 min. Tras lavar y secar las rejillas, los cortes se visualizan en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss M10 (Carl Zeiss).

3.2.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los experimentos citados previamente se lleva a cabo con la herramienta informática GraphPad Prism® 5 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). En los casos en los que los datos presentan una distribución normal se aplica el test paramétrico *t de Student*, y en aquellos en los que los datos no siguen una distribución normal se utiliza el test no paramétrico *U de Mann-Whitney*. Todos los datos numéricos se expresan como media \pm desviación típica de la población. El grado de significatividad se establece en los siguientes rangos: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Histología del cordón umbilical

Las secciones de tejido analizadas nos permiten apreciar que el epitelio umbilical está formado por varios estratos celulares, constituyendo una capa externa firme que protege a los vasos sanguíneos. Bajo el epitelio umbilical observamos la gelatina de Wharton, comprobamos que es un tejido de naturaleza laxa, cuyo componente principal es el colágeno. Observamos también que en la región más próxima al epitelio umbilical, la gelatina presenta una composición más laxa que en las zonas peri e intervasculares, donde el tejido tiene un aspecto más consistente [figura 14 A]. Dispersas por la gelatina localizamos las WJC [figura 14 B]. La mayoría de estas células se encuentran aisladas, aunque es posible visualizar regiones en las que las células se agrupan formando nichos [figura 14 C]. Además, observamos que estas células presentan dos fenotipos diferentes, uno elongado y otro estrellado. En la zona subamniótica las células se distribuyen paralelamente al epitelio umbilical [figura 14 D]. Junto con la gelatina que las embebe, las WJC de las regiones peri e intervascular se orientan de forma concéntrica, rodeando a los vasos umbilicales y constituyendo una túnica pseudo adventicia. El espesor de esta capa es semejante en arterias y vena umbilicales. Sin embargo, en el caso de la túnica media, las arterias presentan un espesor mayor que la vena [figura 15].

La tinción de rojo Sirio nos permite evaluar el componente de colágeno presente en el tejido. Con ella, podemos observar distintas tonalidades que se corresponden con colágeno en distintas etapas de maduración: el colágeno de tipo III (colágeno inmaduro) se aprecia en tonos amarillo-verdosos, mientras que el colágeno de tipo I (colágeno maduro) se observa en tonos rojizos. Al analizar el contenido y la distribución del colágeno en el cordón umbilical, observamos que la única región que carece de este componente es el epitelio umbilical. La gelatina subamniótica, de estructura laxa, contiene una gran cantidad de colágeno de tipo III, mientras que en las regiones peri e intervasculares, donde la gelatina es más compacta, abunda el colágeno

de tipo I. La pared de las arterias umbilicales presenta grandes acumulaciones de colágeno inmaduro en comparación con la vena, que contiene una mayor cantidad de colágeno maduro [figura 16].

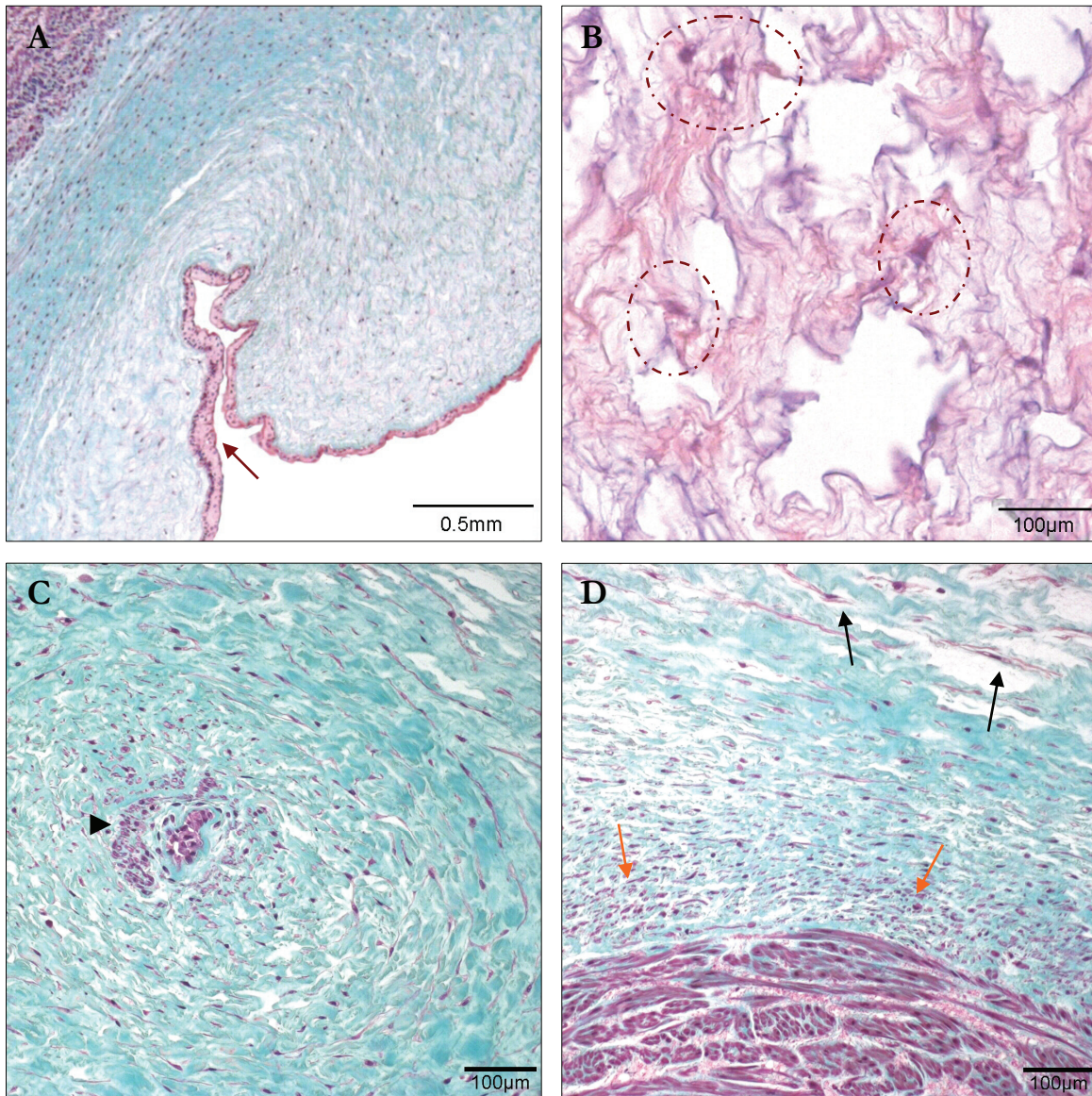


Figura 14: Histología del cordón umbilical. **(A)** El epitelio umbilical está formado por varios estratos celulares (→). Se observa que la gelatina de Wharton está formada principalmente por colágeno, y su estructura es más laxa en la región subamniótica (tinción de tricrómico de Masson, TM, 50 aumentos). **(B)** En las zonas más laxas de la gelatina de Wharton se observan WJC dispersas (----) (tinción de hematoxilina-eosina, HE, 400 aumentos). **(C)** Detalle de un nicho de WJC (▶) (Tinción TM, 200 aumentos). **(D)** Las WJC presentan dos fenotipos diferenciados: elongado (→) y estrellado (→) (tinción TM, 200 aumentos). Imágenes tomadas con un microscopio óptico de campo claro.

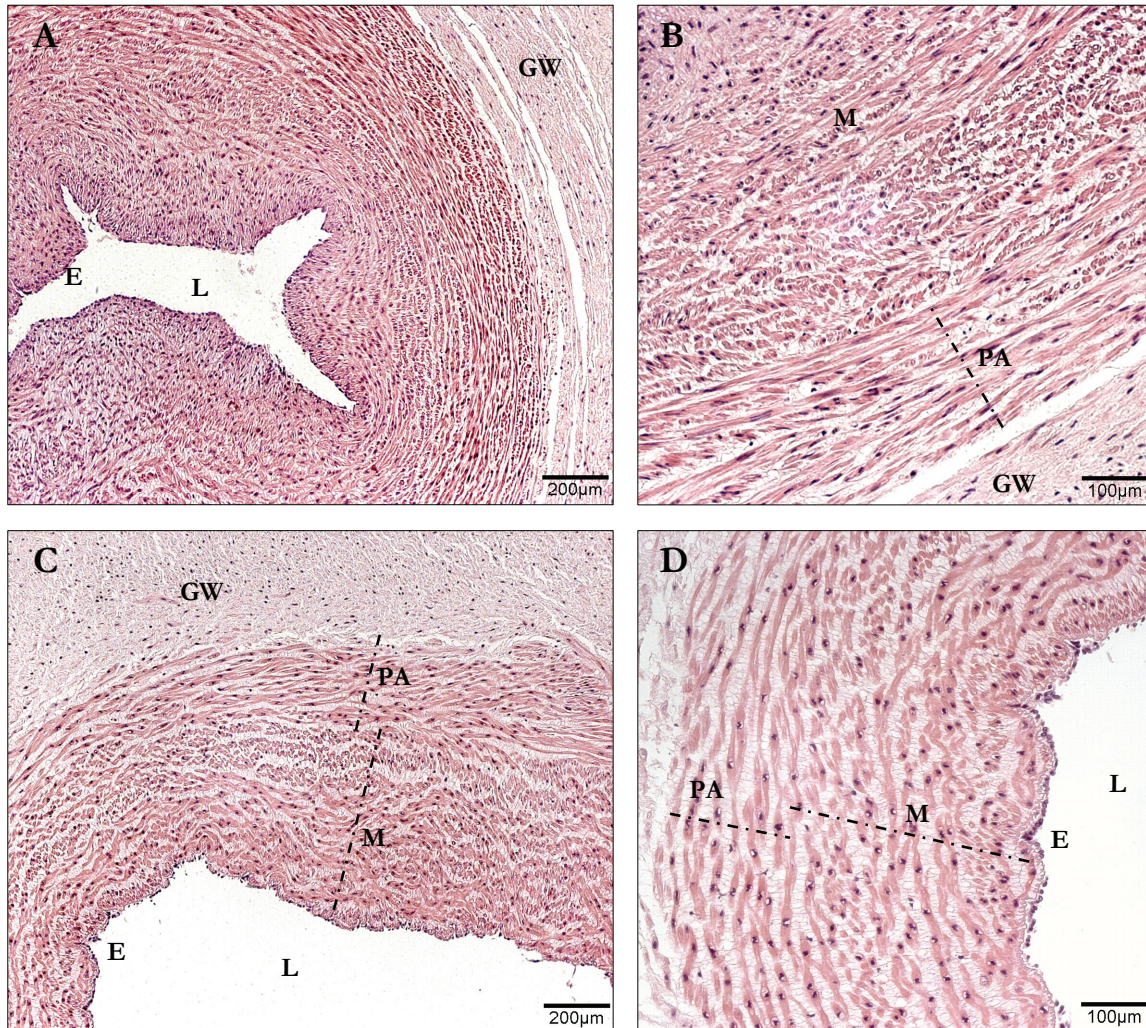


Figura 15: Estructura de los vasos umbilicales. **(A)** En la pared arterial se puede observar una túnica íntima delgada, una túnica media de notable espesor y una pseudoadventicia formada por las WJC embebidas en la matriz de la gelatina y colágeno, dispuestas de forma concéntrica alrededor del vaso (tinción HE, 100 aumentos). **(B)** Detalle de las túnicas media y pseudoadventicia de la arteria umbilical (tinción HE, 400 aumentos). **(C)** Comparativamente, la túnica media de la vena umbilical es más delgada, aunque el espesor de la pseudoadventicia es semejante al observado en la arteria (tinción HE, 100 aumentos). **(D)** Detalle de las túnicas íntima, media y pseudoadventicia de la vena umbilical (tinción HE, 400 aumentos). E = Endotelio; L = Lumen del vaso; GW = Gelatina de Wharton; M = Túnica media; PA = Pseudoadventicia.

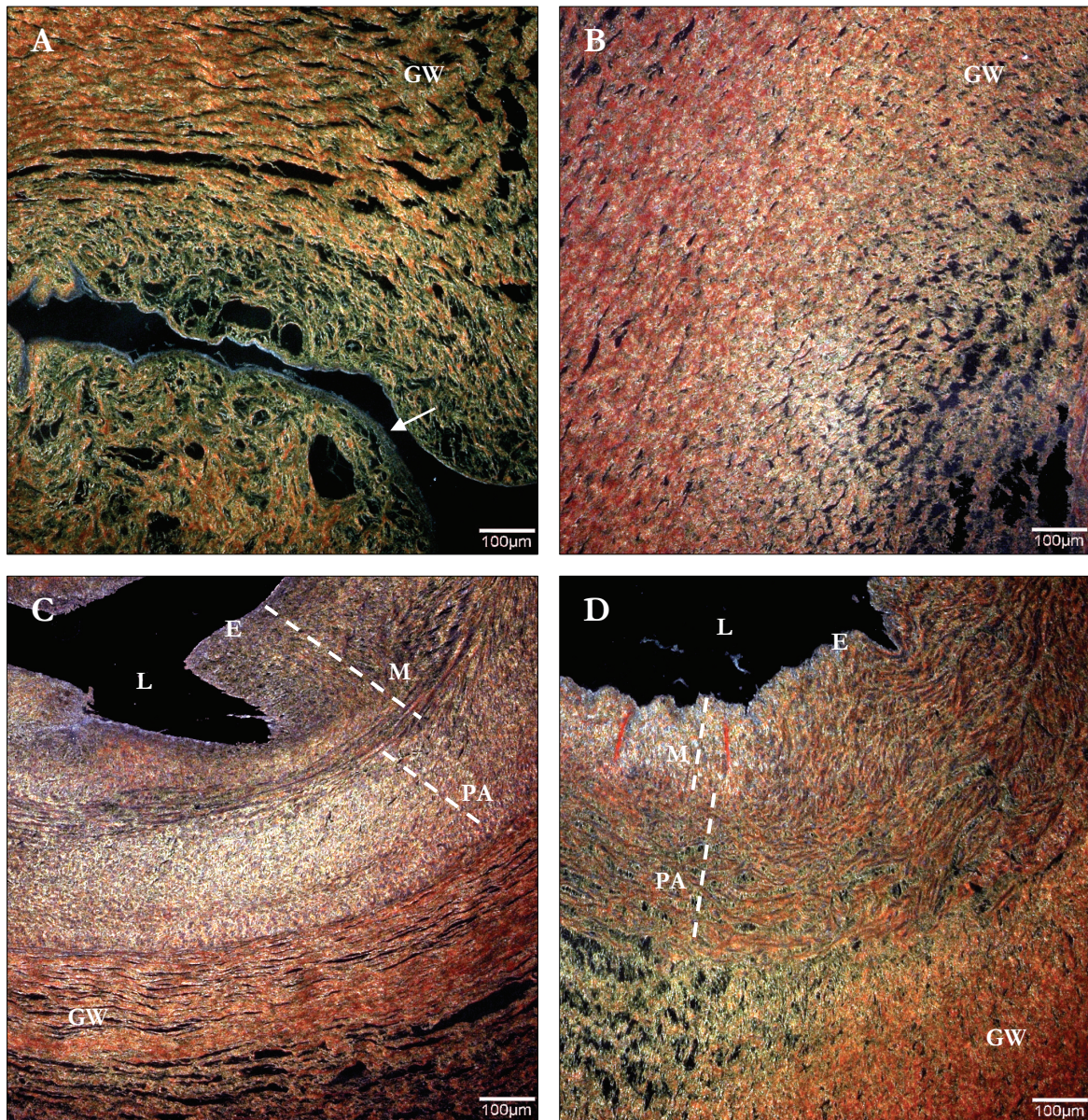


Figura 16: Organización de las fibras de colágeno en el cordón umbilical. **(A)** El epitelio umbilical (→) carece de componente colágeno. La gelatina subamniótica tiene estructura laxa y está formada por gran cantidad de colágeno inmaduro (tipo III). **(B)** La gelatina inter y perivascular, de consistencia más compacta, presenta una mayor cantidad de colágeno maduro (tipo I). **(C)** En la pared arterial predomina el colágeno inmaduro, que contrasta con el colágeno maduro presente en la gelatina perivascular. **(D)** La pared venosa contiene grandes cantidades de colágeno maduro (tinción RS, todas a 100 aumentos). E = Endotelio; L = Lumen del vaso; GW = Gelatina de Wharton; PA = Pseudoadventicia; M = Túnica media.

3.3.2 Morfología de HUVEC en cultivo

Tras 24 h del aislamiento, las HUVEC se adhieren al frasco de cultivo formando colonias concéntricas de células. De forma gradual, estas colonias incrementan de tamaño mediante la interacción entre células. Las células situadas en las regiones más externas de la colonia adoptan una estructura en empalizada que se asemeja a la distribución de las células endoteliales en los vasos nativos. A medida que las células proliferan, las colonias contactan entre sí hasta formar una monocapa celular con aspecto de empedrado, que tapiza la superficie del frasco de cultivo [figura 17].

La morfología poligonal de las HUVEC se puede observar en las primeras etapas del cultivo. A partir del tercer subcultivo, el citoplasma celular aumenta de volumen, haciendo que el cultivo pierda su aspecto empedrado característico, comenzando a aparecer regiones denudadas en la superficie del frasco de cultivo. También es frecuente la presencia de células con aspecto dendrítico y evidentes signos de degeneración y senescencia [figura 18].

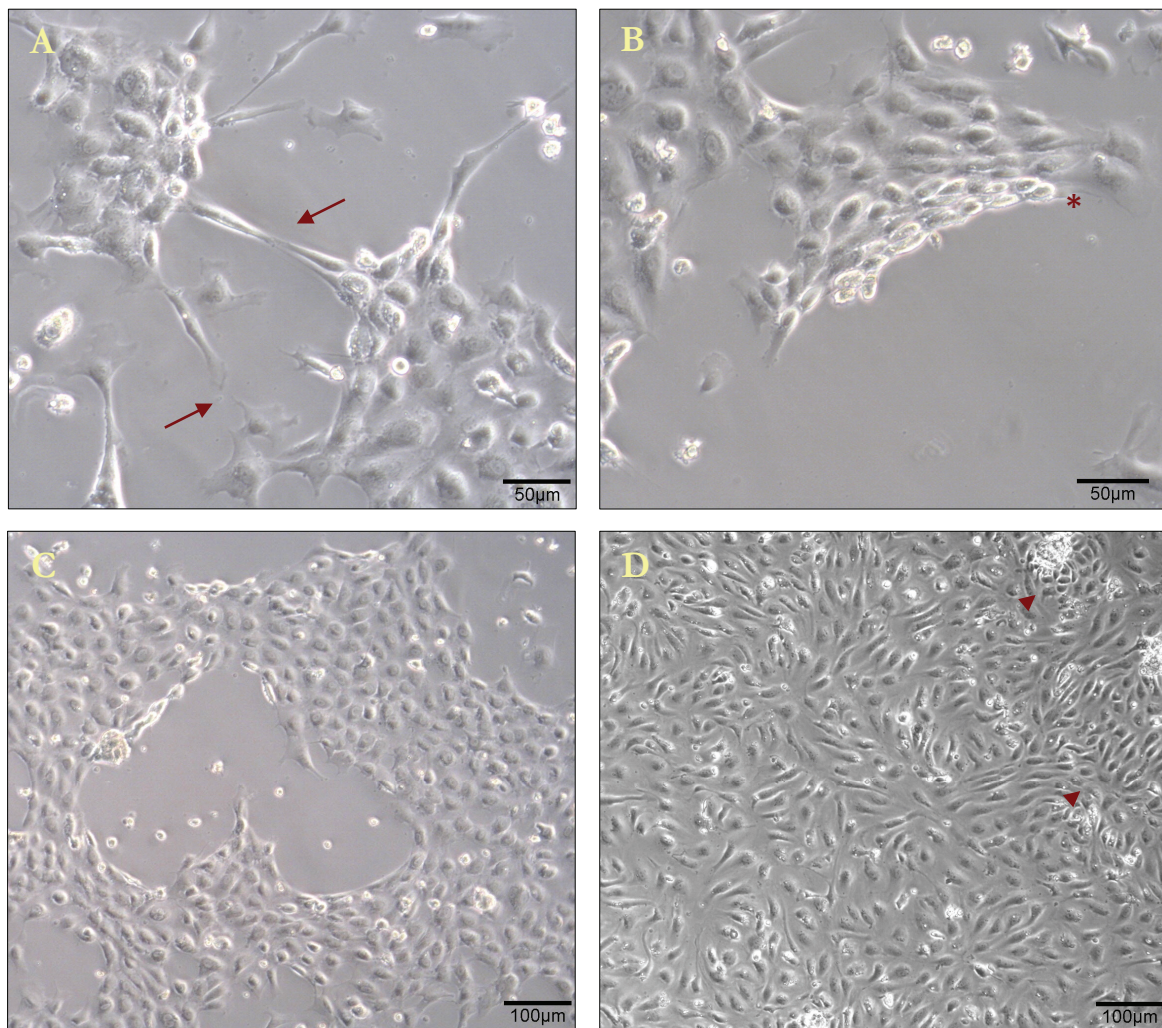


Figura 17: Expansión en cultivo de las células endoteliales de vena umbilical. **(A)** Las HUVEC se adhieren al frasco de cultivo formando colonias concéntricas; las colonias vecinas conectan entre sí mediante interacciones celulares (→) (100 aumentos). **(B)** Detalle de una colonia de HUVEC en la que se aprecia una estructura en empalizada (*) (100 aumentos). **(C)** La expansión de las HUVEC se produce a medida que las colonias van interaccionando entre sí (200 aumentos). **(D)** Monocapa de células en la que todavía se pueden distinguir colonias celulares (▶) (200 aumentos). Imágenes tomadas con un microscopio óptico invertido de contraste de fases.

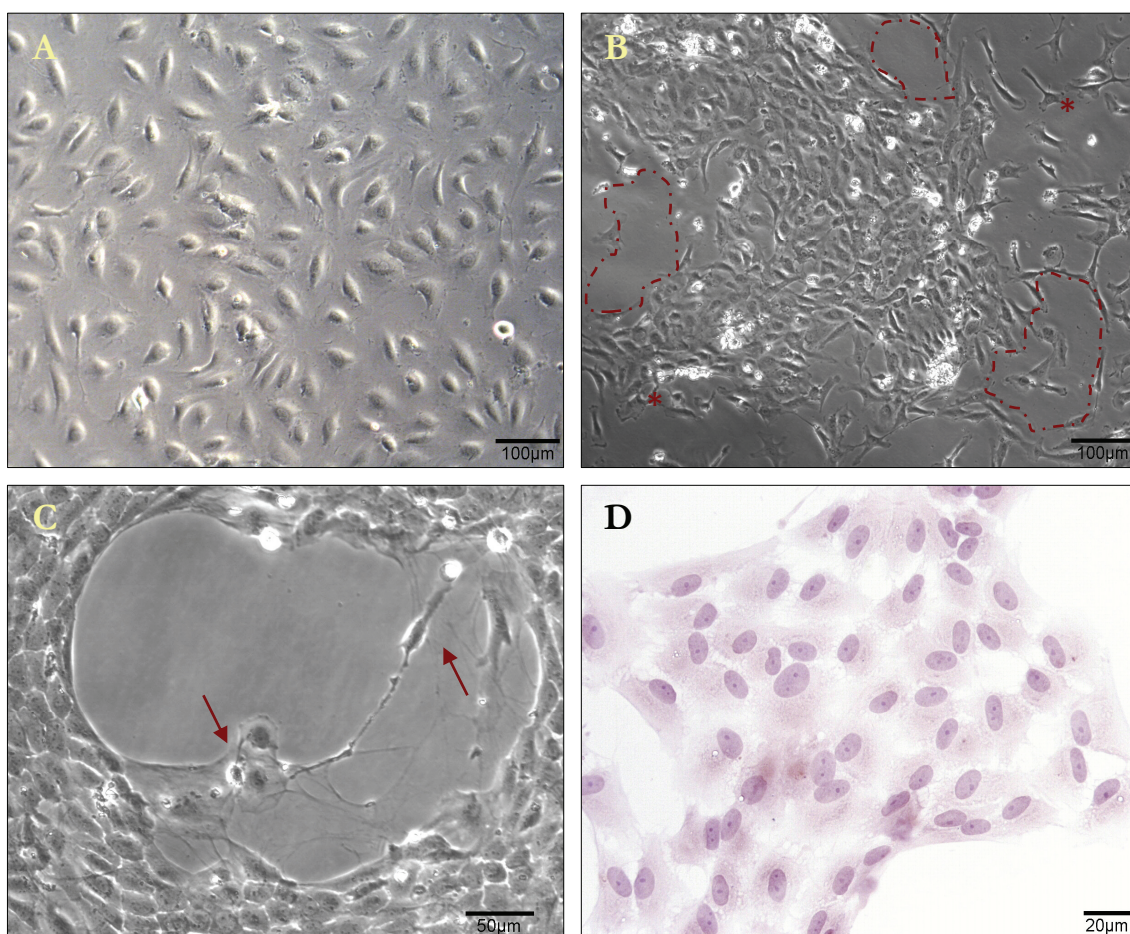


Figura 18: Cambios en la morfología de HUVEC en cultivo a partir del tercer subcultivo. **(A)** Al incrementar el volumen citoplasmático, los cultivos de HUVEC pierden su aspecto de empedrado característico (100 aumentos). **(B)** Aspecto de HUVEC en quinto subcultivo en el que se puede apreciar un evidente cambio en la morfología celular (*) así como regiones con denudación endotelial (---) (100 aumentos). **(C)** Células senescentes en un cultivo de HUVEC en tercer subcultivo (→) (200 aumentos). **(D)** Detalle de una colonia de HUVEC del tercer subcultivo (tinción HE, 400 aumentos).

3.3.3 Morfología de WJC en cultivo

Pasados aproximadamente 5-7 días tras la digestión enzimática, las células migran desde los pequeños explantos de gelatina digerida y se adhieren a la superficie del frasco de cultivo, iniciando su expansión. En este punto el cultivo de WJC tiene un aspecto pleomórfico, en el que la mayoría de las células son de pequeño tamaño y presentan un fenotipo elongado, cohabitando con otras de aspecto estrellado. Una vez que las WJC se han adherido a la superficie del frasco de cultivo, éstas se expanden rápidamente,

alcanzando la confluencia pasados 4 días, momento a partir del cual se aprecia el inicio de un crecimiento en multicapa [figura 19].

Tras la primera tripsinización, las WJC presentan un incremento de tamaño, y la proporción de células con fenotipo estrellado aumenta con respecto al cultivo primario. Ocasionalmente puede observarse la presencia de células multinucleadas. A partir del primer subcultivo, las células comienzan a liberar al medio de cultivo secreciones de lo que podrían ser componentes de matriz extracelular [figura 20].

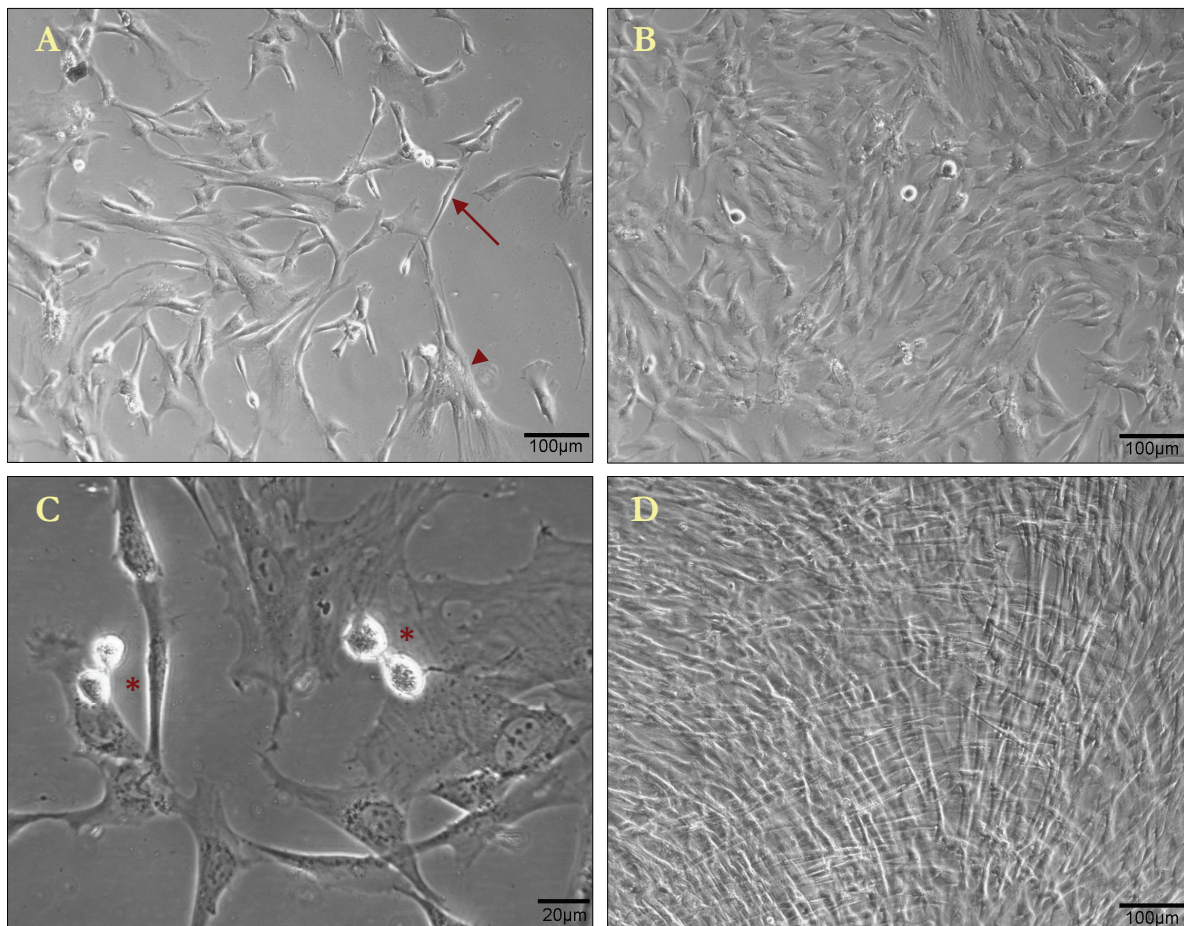


Figura 19: Expansión en cultivo de las células de la gelatina de Wharton tras su aislamiento. **(A)** En los primeros días de la expansión, se pueden observar células con fenotipo elongado (→) y estrellado (►) (100 aumentos). **(B)** Aspecto de un cultivo primario de WJC en estado confluyente (100 aumentos). **(C)** Detalle de dos divisiones mitóticas (*) observadas en el cultivo primario (400 aumentos). **(D)** Cuando la confluencia en cultivo supera el 80% se puede apreciar claramente la disposición en multicapa de las WJC (100 aumentos).

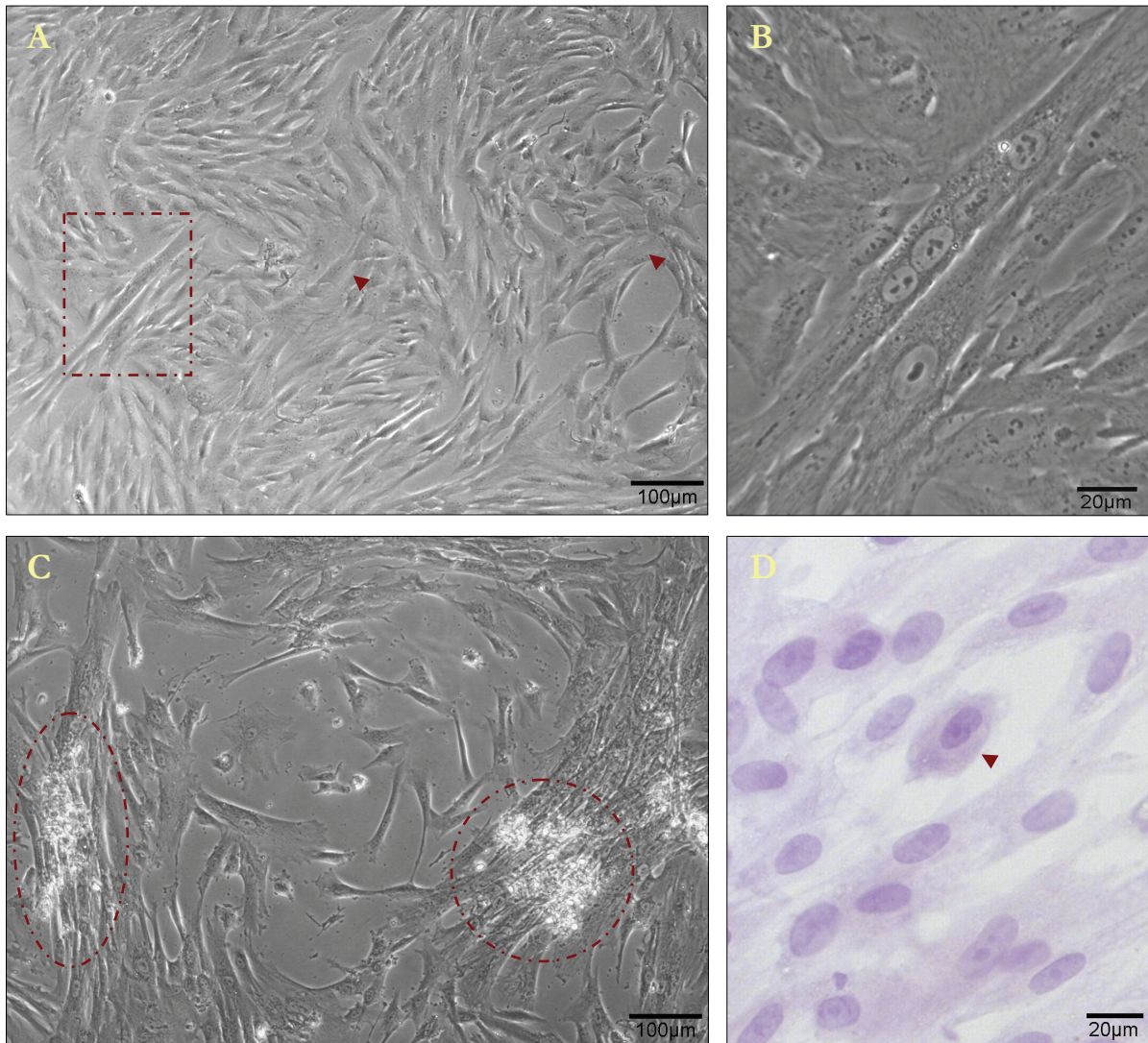


Figura 20: Células de la gelatina de Wharton en primer subcultivo. **(A)** El número de células estrelladas (►) incrementa gradualmente con el paso del tiempo (100 aumentos). **(B)** Detalle de una célula plurinucleada recuadrada en la imagen anterior (400 aumentos). **(C)** Los productos de secreción de las WJC se pueden apreciar a partir del primer subcultivo (----) (100 aumentos). **(D)** Detalle de una célula estrellada (►) (tinción HE, 400 aumentos).

En los sucesivos subcultivos, el fenotipo de las WJC se torna filamentososo y el tamaño celular aumenta de forma notable [figura 21].

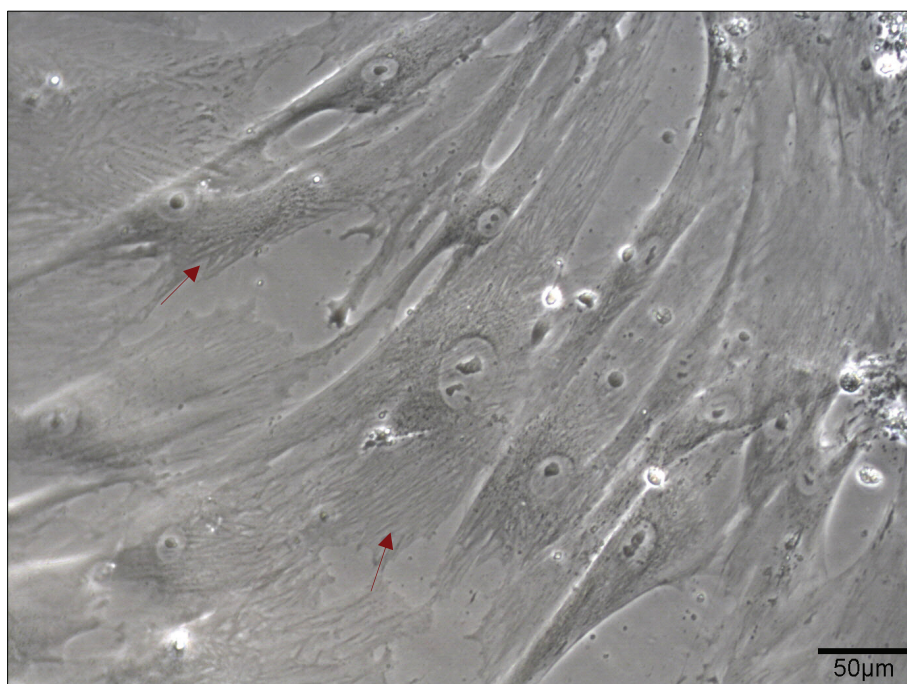


Figura 21: Células de la gelatina de Wharton en quinto subcultivo. Se puede observar un elevado número de filamentos en el citoplasma celular (→) (200 aumentos).

Los análisis ultraestructurales de WJC revelan que estas células poseen un núcleo de gran tamaño con nucleolos prominentes. La actividad secretora viene dada por la presencia de numerosas vesículas de secreción acompañadas de un retículo endoplasmático muy desarrollado, cuyas cisternas aparecen dilatadas en algunas células. También poseen abundantes lisosomas primarios, secundarios y cuerpos residuales, así como cuerpos multivesiculares y mitocondrias.

El citoplasma es discretamente electrodenso, debido a la gran cantidad de ribosomas y polirribosomas que contiene [figura 22]. Gradualmente, la ultraestructura de estas células se va modificando a medida que avanzan los subcultivos, coincidiendo con los cambios fenotípicos observados a microscopía óptica de contraste de fases, descritos previamente. Así, en el tercer subcultivo, las WJC presentan nucleolos menos patente, observándose también un incremento en la heterocromatina periférica [figura 22]. En estas células se puede apreciar una disminución en el número de vesículas de secreción y lisosomas. Las cisternas del retículo endoplasmático se ven reducidas en

número, quedando localizadas principalmente en las regiones perinucleares [figuras 22 y 23]. Junto con estos cambios se observa un incremento en la adhesión intercelular, ya que las células se muestran proclives a la fusión de sus citoplasmas [figura 22].

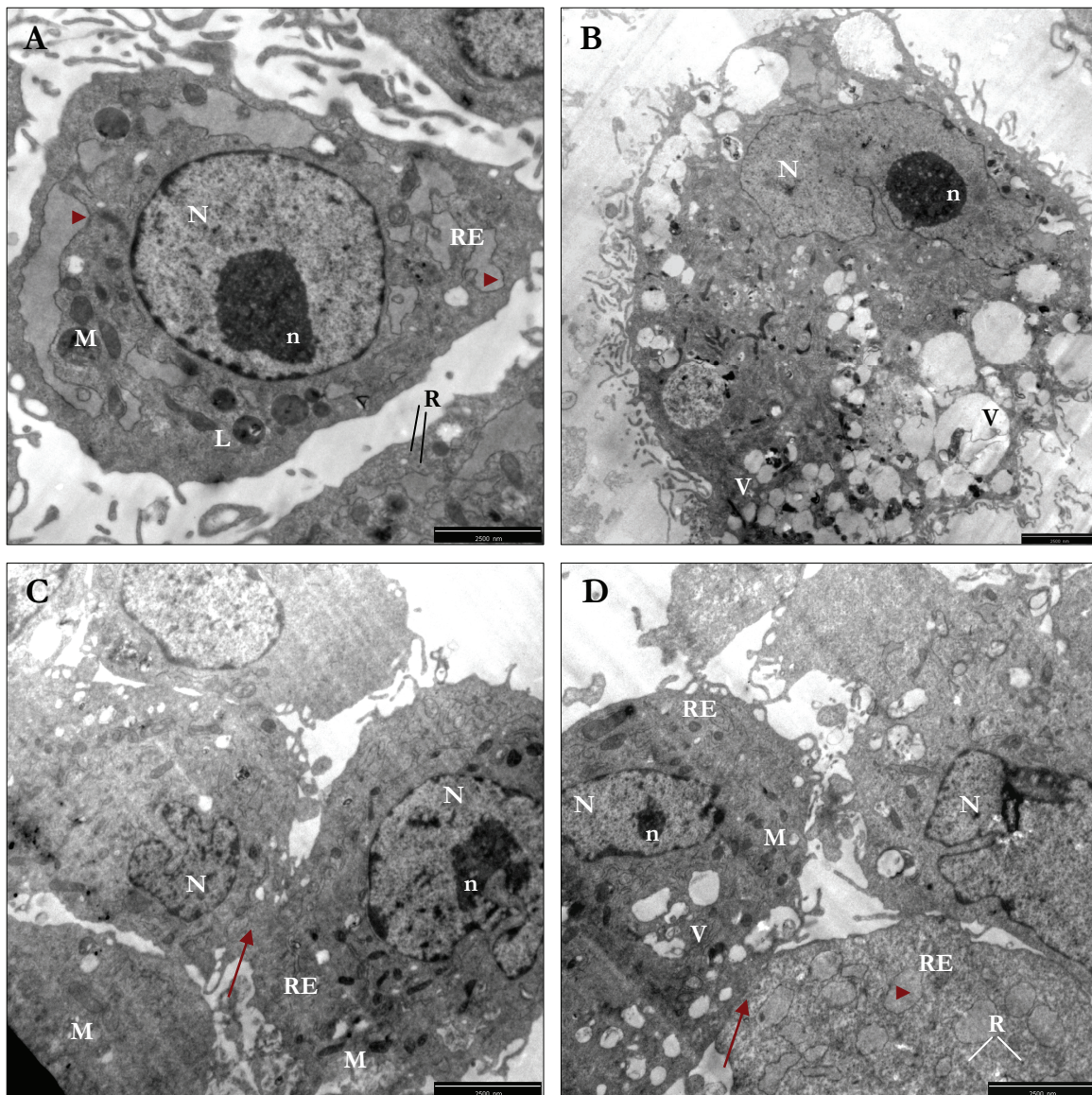


Figura 22: Ultraestructura de WJC en primer y tercer subcultivo. **(A)** Las WJC del primer subcultivo poseen un núcleo de gran tamaño, con uno o varios nucleolos y abundante retículo endoplasmático, que en ocasiones presenta cisternas dilatadas (►). **(B)** Montaje panorámico de WJC en primer subcultivo: se puede apreciar la actividad secretora determinada por el elevado número de vesículas de secreción. **(C, D)** En el tercer subcultivo, las células presentan nucleolos menos patentes, las cisternas de retículo endoplasmático se sitúan en las zonas perinucleares, y las células tienden a fusionar sus citoplasmas (→). Imágenes tomadas con un microscopio electrónico de transmisión, MET, a 2.500 aumentos. L = Lisosomas; M = Mitocondrias; N = Núcleo; n = nucleolo; R = Ribosomas; RE = Retículo endoplasmático; V = Vesículas de secreción.

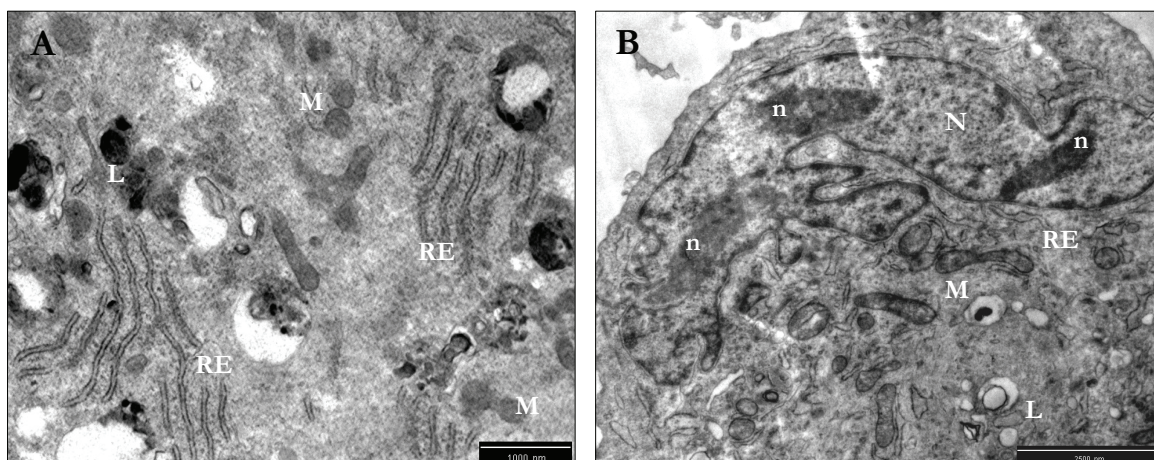


Figura 23: Ultraestructura de WJC en primer y tercer subcultivo. **(A)** En el primer subcultivo, los orgánulos se encuentran repartidos a lo largo de todo el citoplasma celular (MET, 5.000 aumentos). **(B)** Cuando las WJC alcanzan el tercer subcultivo, se puede apreciar un cambio en la cantidad y disposición de los orgánulos, los cuales predominan en las regiones perinucleares (MET, 4.000 aumentos). En ambos casos el citoplasma aparece electrodensito debido a la presencia de ribosomas y polirribosomas. L = Lisosomas; M = Mitochondrias; N = Núcleo; n = nucleolo; RE = Retículo endoplasmático; V = Vesículas de secreción.

3.3.4 Morfología de Dif-WJC en cultivo

Cuando las WJC del cultivo primario alcanzan la confluencia, se tripsinizan y la suspensión celular resultante se distribuye en dos grupos: mientras que la mitad de las células se mantiene en cultivo con medio AmnioMAX™-C100, las células restantes se comienzan a cultivar con medio M199 completo, estableciendo así la estirpe Dif-WJC.

Las Dif-WJC presentan modificaciones morfológicas con respecto a WJC desde el inicio de la diferenciación. Tras un periodo de 5 días en cultivo con M199, las Dif-WJC del primer subcultivo muestran un aspecto estrellado, así como un notable incremento en su volumen citoplasmático. Aunque mantienen su actividad secretora, ésta se ve disminuida [figura 24].

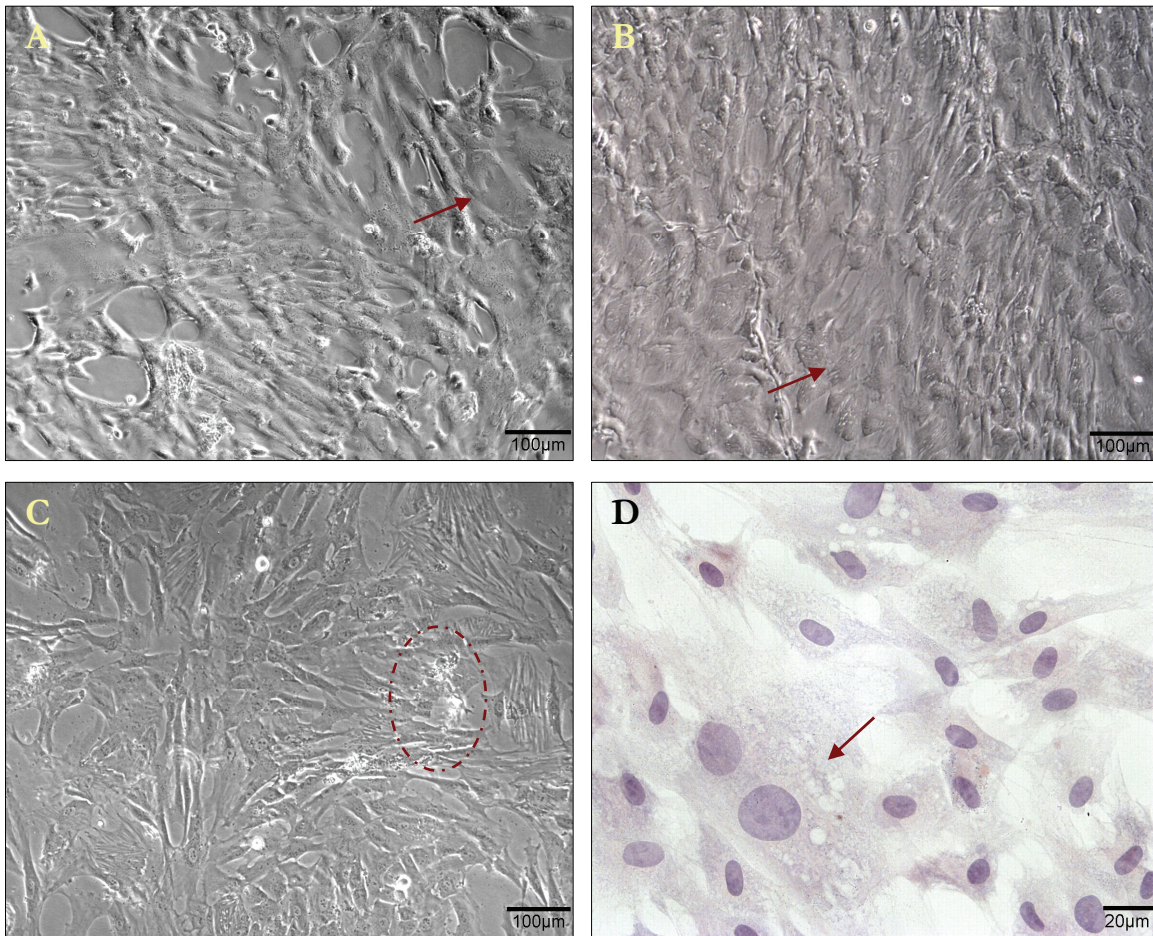


Figura 24: Morfología de Dif-WJC al inicio de la diferenciación. **(A, B)** Las células, al ser cultivadas en medio M199, reaccionan modificando su morfología. Las células se tornan poligonales y su citoplasma aumenta de volumen al cabo de 5 días en cultivo (→) (100 aumentos). **(C)** La actividad secretora de Dif-WJC es inferior a la observada en su predecesoras, WJC (----) (100 aumentos). **(D)** Detalle de un cultivo en el que se aprecia el incremento en volumen de las Dif-WJC (tinción HE, 400 aumentos).

Con el avance de los subcultivos, el aspecto de Dif-WJC continúa sufriendo modificaciones; las células pierden su aspecto elongado y el citoplasma se vuelve cada vez más grande y filamentoso, de manera que ya en el tercer subcultivo las células tienen un aspecto similar al que presentaban las WJC del quinto subcultivo [figura 25].

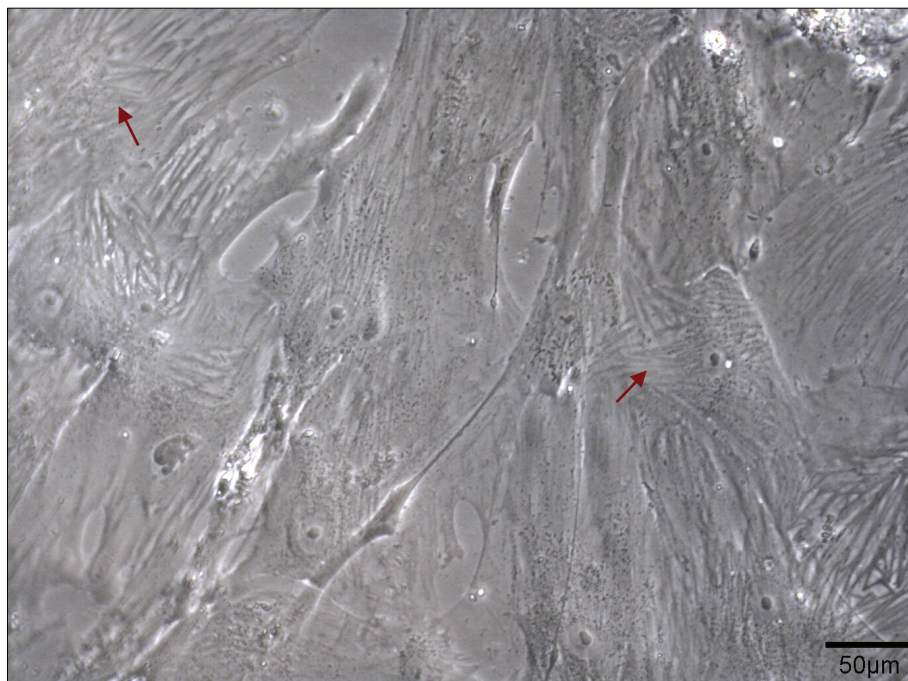


Figura 25: Células Dif-WJC en tercer subcultivo. Se puede apreciar que el aspecto de estas células es semejante al de las WJC del quinto subcultivo [representado en la figura 21] aunque el tamaño de su citoplasma es mayor y los filamentos están más patentes (→) (200 aumentos).

Las características ultraestructurales que presentan las Dif-WJC al inicio de la diferenciación, aunque semejantes a las observadas en WJC, presentan algunas diferencias. En el primer subcultivo, las células poseen núcleos con cromatina laxa y nucleolos patentes. En el citoplasma hay vesículas de secreción, cisternas de retículo endoplasmático, lisosomas primarios y secundarios y abundantes ribosomas. Las mitocondrias poseen crestas bien conservadas y en el interior de algunas de ellas se pueden observar cuerpos densos [figura 26].

El evento más significativo que diferencia a las Dif-WJC de las WJC es que, una vez comenzada la diferenciación celular, algunas de las células evaluadas presentan en su citoplasma acúmulos de miofibrillas, que podrían representar un proceso de diferenciación y formación de un citoesqueleto fibrilar compatible con la presencia de filamentos de actina en el citoplasma de estas células [figura 26].

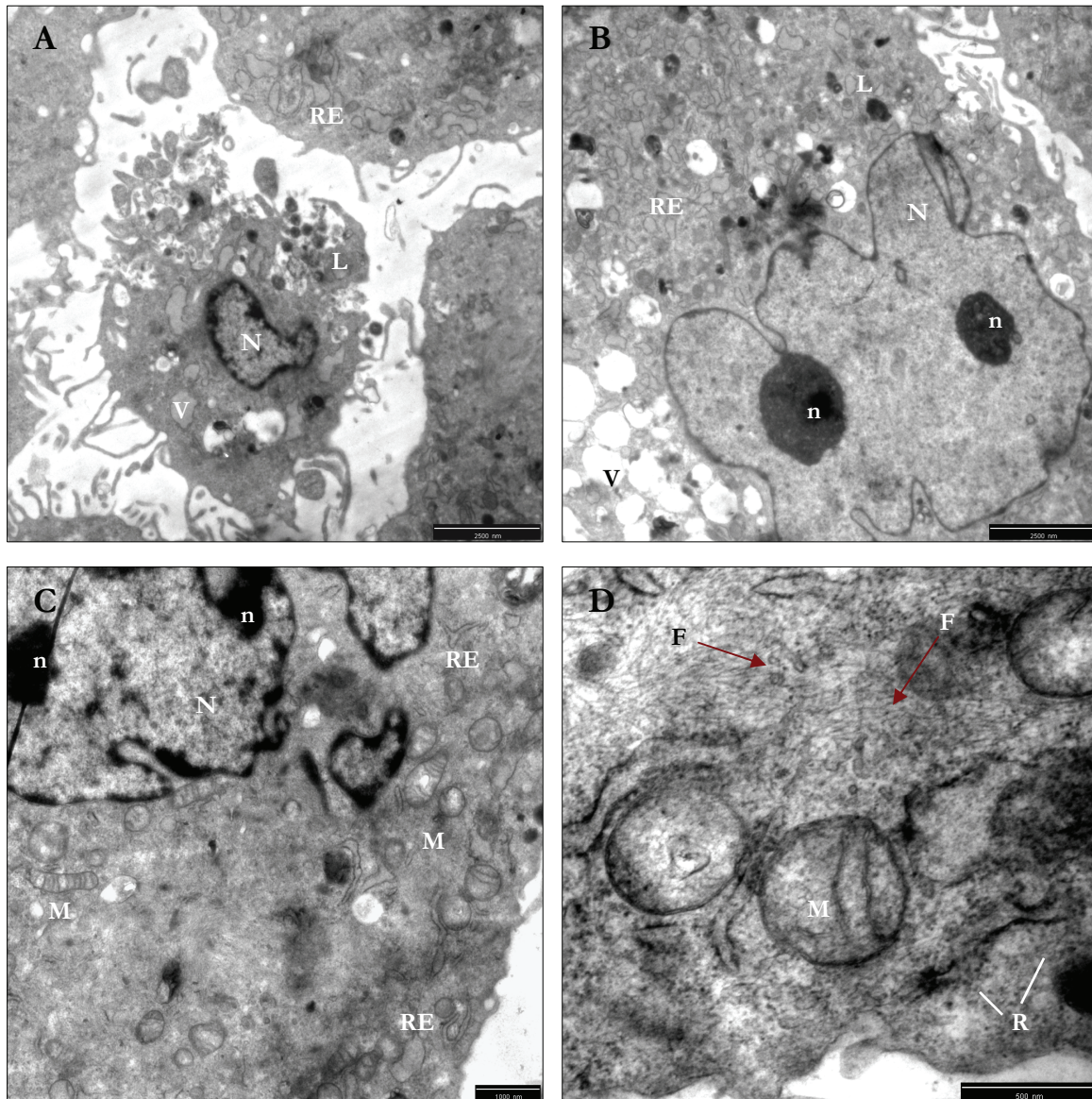


Figura 26: Ultraestructura de Dif-WJC al inicio de la diferenciación endotelial. **(A, B)** Las Dif-WJC del primer subcultivo poseen un núcleo escotado con cromatina laxa y nucleolos de gran tamaño (MET, 2.500 aumentos). **(C)** El citoplasma celular presenta abundante retículo endoplasmático, múltiples ribosomas y polirribosomas, así como cuerpos densos, compatibles con lisosomas primarios y secundarios (MET, 5.000 aumentos). **(D)** La característica más singular de Dif-WJC es el cambio citoplasmático referente a la presencia de componentes fibrilares, que puede significar el inicio de la formación de un esqueleto fibrilar (→) de características compatibles con un esqueleto de actina (MET, 20.000 aumentos). F = Fibrillas; L = Lisosomas; M = Mitocondrias; N = Núcleo; n = nucleolo; R = Ribosomas; RE = Retículo endoplasmático; V = Vesículas de secreción.

3.3.5 Diferencias morfológicas entre WJC y Dif-WJC

A pesar de que WJC y Dif-WJC provienen de la misma fuente celular, el hecho de ser cultivadas en distintos medios de cultivo hace que estas células presenten una serie de cambios a nivel morfológico que son observables, no sólo a microscopía electrónica de transmisión, sino también bajo el microscopio óptico. La siguiente tabla [tabla 6] resume las diferencias observadas entre WJC y Dif-WJC entre el primer y el quinto subcultivo.

WJC	Dif-WJC
- Fenotipos elongado y estrellado.	- Fenotipo poligonal.
- Ligero incremento en tamaño con el avance de los subcultivos.	- Notable incremento en tamaño con el avance de los subcultivos.
- Actividad secretora intensa.	- Actividad secretora moderada.
- Citoplasma filamentosos en 5° subcultivo.	- Citoplasma filamentosos en 3° subcultivo.
- Cromatina menos laxa.	- Cromatina más laxa.
- Menos ribosomas libres.	- Más ribosomas libres y polirribosomas.
- Mitocondrias menos abundantes.	- Mitocondrias más abundantes.
- Más cisternas de retículo endoplasmático.	- Menos cisternas de retículo endoplasmático.
- Fusión citoplasmática.	- Células más individualizadas.

Tabla 6: Diferencias estructurales y ultraestructurales entre WJC y Dif-WJC durante los primeros pases en cultivo (entre el primer y el quinto subcultivo).

3.3.6 Crecimiento, viabilidad y proliferación de WJC, Dif-WJC y HUVEC

El método de exclusión del Azul Tripán, mediante el recuento del número total de células vivas en cada tiempo de estudio, nos permite cuantificar y diseñar una curva que refleja el crecimiento de las células en cultivo a lo largo del tiempo. Partiendo de

una concentración de células del primer subcultivo de 8×10^3 células/cm², y tras 10 días de estudio, las WJC multiplican su población casi 10 veces, cifra considerablemente mayor que la observada en las demás estirpes celulares, ya que Dif-WJC y HUVEC incrementan el número de células 4 y 3,5 veces, respectivamente [figura 27]. A partir del día 5 de estudio, las WJC presentan un crecimiento significativamente mayor que las Dif-WJC y las HUVEC (**p<0,01), y esta diferencia incrementa con el tiempo (**p<0,001). Al finalizar el tiempo de estudio (10 días), las WJC mantienen un estado proliferativo, hecho que no se observa en Dif-WJC ni HUVEC, ya que estas células han alcanzado la denominada “fase de meseta” de la curva de crecimiento.

Para calcular el tiempo de duplicación de cada estirpe celular interpolamos en la curva de crecimiento un valor que corresponde al doble de la concentración celular sembrada inicialmente. En este caso, dicho valor es de 16.000 células/cm² (el doble de 8×10^3). Al intercalarlo en las curvas de crecimiento previamente diseñadas, comprobamos que las WJC son la estirpe celular con mayor velocidad de proliferación, ya que duplican su población en aproximadamente 13 h, mientras que la estirpe diferenciada Dif-WJC tarda 17 h en doblar su número de células y HUVEC 34 h [figura 27].

Los resultados obtenidos mediante los recuentos celulares indican que la población de WJC del primer subcultivo presenta un mayor crecimiento con respecto a Dif-WJC y HUVEC [figura 27]. En un intento de corroborar estos resultados, realizamos un estudio comparando la capacidad proliferativa de estas estirpes celulares. Para ello, empleamos un equipo xCELLigence Real Time Cell Analyzer y partimos de una concentración celular inicial de $1,5 \times 10^4$ cel/cm². Tras un periodo de estudio de 100 h, los resultados obtenidos con células del primer subcultivo muestran que tanto WJC como Dif-WJC presentan niveles de proliferación equivalentes. El índice celular es ligeramente mayor en el caso de las Dif-WJC, sin mostrar diferencias significativas con respecto a WJC. En comparación, las HUVEC no sólo tienen un índice celular inferior, sino que al finalizar el estudio han perdido su capacidad proliferativa y el cultivo se

encuentra en una fase de declive, bien por senescencia celular, bien por inhibición por contacto [figura 28].

En el caso de WJC y Dif-WJC, el xCELLigence representa valores de índice celular semejantes para ambas estirpes tras 100 h de estudio. Este dato podría resultar contradictorio con los resultados obtenidos con recuentos celulares, en los que se puede apreciar que tras 4 días de estudio -que son aproximadamente 100 h- las WJC se encuentran en estado proliferativo, mientras que las Dif-WJC están iniciando la fase de meseta [figura 27]. Teniendo en cuenta los resultados de los recuentos celulares y el método de análisis del xCELLigence, se puede afirmar que la similitud en los valores del índice celular obtenidos en los ensayos de proliferación se deben a que las Dif-WJC tienen un mayor tamaño que las WJC, de manera que el número de células por unidad de superficie será más bajo en el caso de las Dif-WJC, tal y como se puede apreciar en la figura 29 [figura 29].

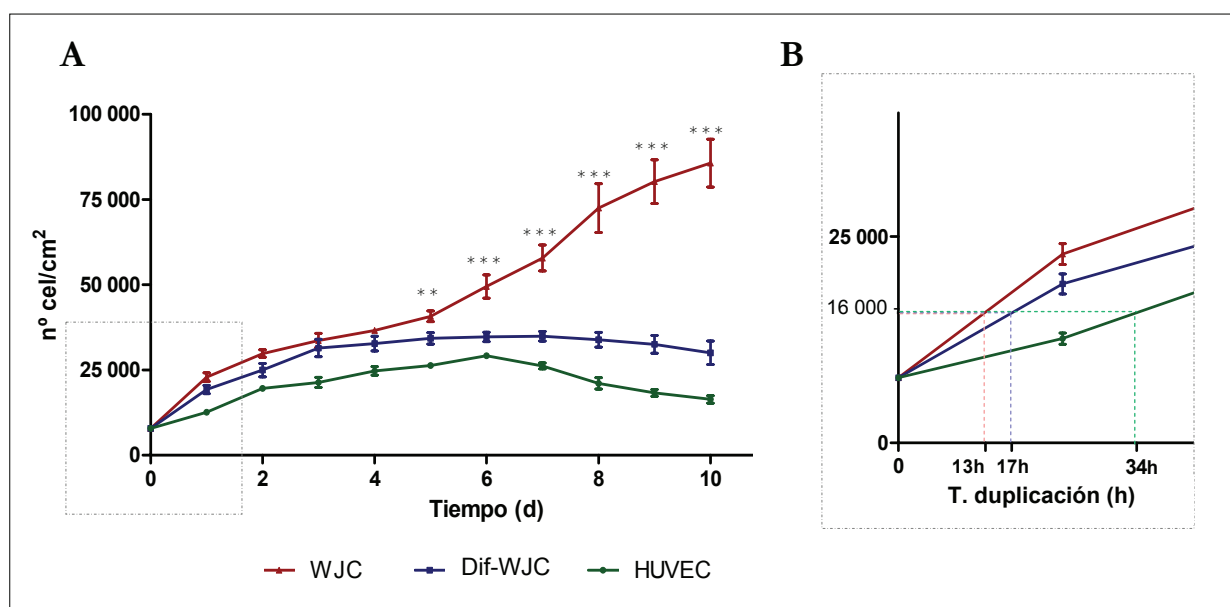


Figura 27: Crecimiento de las poblaciones WJC, Dif-WJC y HUVEC del primer subcultivo, cuantificado mediante el método de exclusión del Azul Tripán. **(A)** Las WJC presentan un crecimiento exponencial durante todo el periodo de estudio, multiplicando por 10 su población tras 10 días en cultivo. Las diferencias en el crecimiento de WJC con respecto a Dif-WJC y HUVEC presentan diferencias significativas a partir del día 5 de estudio (** $p < 0,01$), y aumentan con el avance de los días (** $p < 0,001$). **(B)** Detalle de las primeras horas del estudio (área recuadrada en la gráfica anterior) con el tiempo de duplicación calculado para cada estirpe celular: 13 h para WJC, 17 h para Dif-WJC y 34 h para HUVEC.

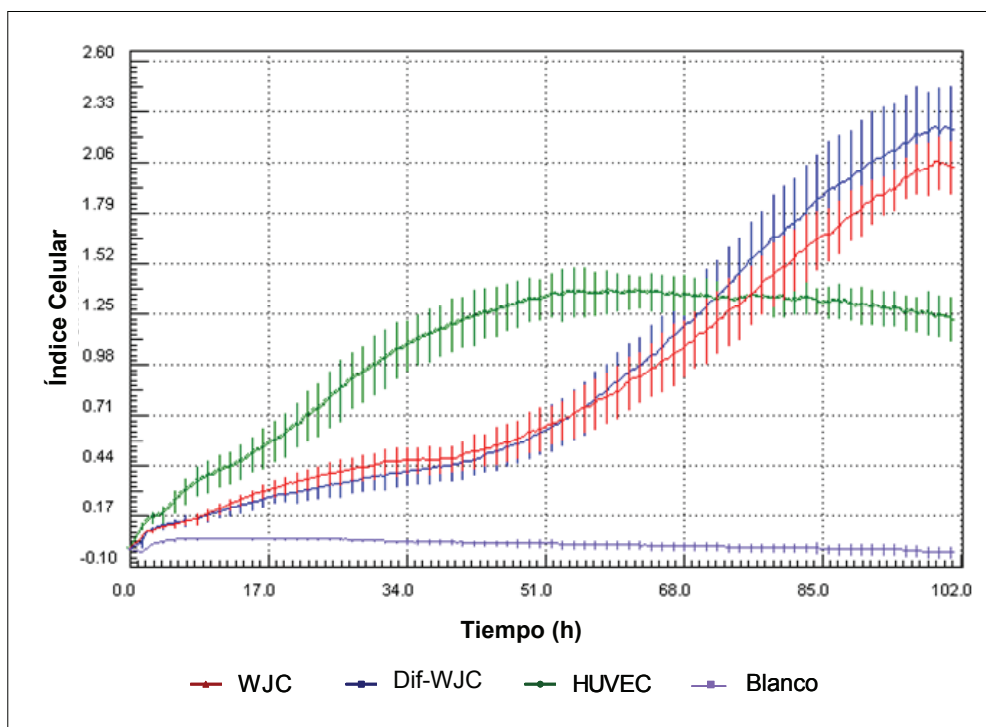


Figura 28: Gráfica de proliferación celular de WJC, Dif-WJC y HUVEC del primer subcultivo, obtenida con el equipo xCELLigence Real Time Cell Analyzer. Los valores del índice celular de las WJC y Dif-WJC son semejantes, y ambas estirpes muestran un estado proliferativo tras 100 h de estudio. Por el contrario, las HUVEC dejan de proliferar tras un periodo de aproximadamente 50 h. El blanco que se emplea en estos experimentos es el propio medio de cultivo, con la finalidad de demostrar que el índice celular medido por el aparato en cada grupo de estudio no se ve afectado por el medio de cultivo.

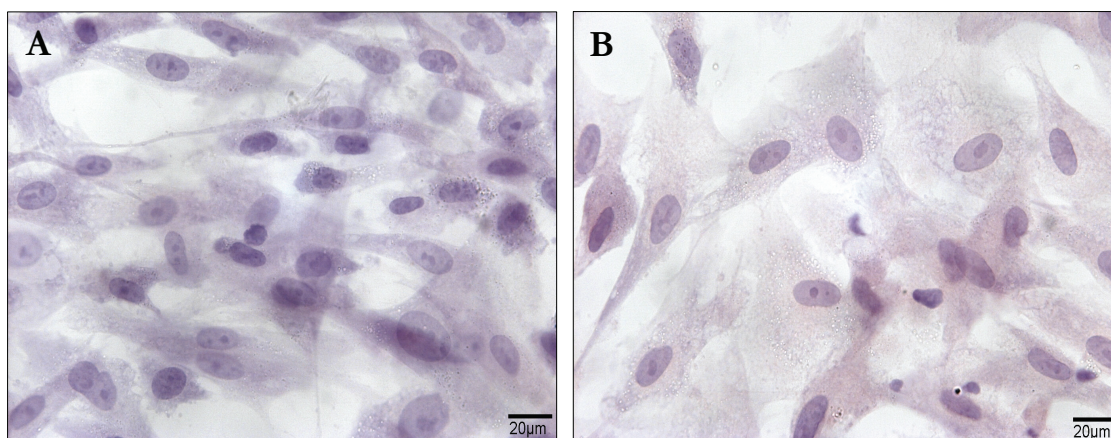


Figura 29: Aspecto de WJC y Dif-WJC del primer subcultivo tras 100 h en cultivo. Estas imágenes son representativas de los cultivos, y en ellas se puede observar que el número de células por unidad de superficie es mayor en (A) la población de WJC que en (B) Dif-WJC. Del mismo modo, se observa que el tamaño de las WJC (A) es sensiblemente inferior que el observado en las Dif-WJC (B) (tinción HE, ambas imágenes a 400 aumentos).

Finalmente, para determinar si las diferencias observadas entre WJC y Dif-WJC en cuanto al crecimiento y la proliferación se deben a variaciones en la viabilidad celular, realizamos un análisis mediante el ensayo colorimétrico del AlamarBlue®. Para ello, utilizamos cultivos de WJC y Dif-WJC del primer, tercer y quinto subcultivo, a una concentración inicial de $1,5 \times 10^4$ cel/cm² y medimos la viabilidad del cultivo en un periodo de estudio de 48 h.

Los resultados obtenidos muestran que, durante las primeras 2 h, ambas estirpes celulares presentan una leve disminución en la viabilidad a consecuencia del periodo de adaptación que éstas necesitan para aclimatarse al nuevo medio ambiente tras la tripsinización. Esta aclimatación sucede más rápidamente en las Dif-WJC. Una vez adaptadas al nuevo entorno, las células comienzan a proliferar, y se pueden apreciar dos hechos importantes: por un lado, se observa que los niveles de viabilidad son semejantes en ambas estirpes celulares, con independencia del medio de cultivo empleado. Además, la viabilidad de WJC y Dif-WJC no disminuye en ninguno de los subcultivos analizados durante las 48 h de estudio. Todos estos resultados se recogen en la figura 30 [figura 30].

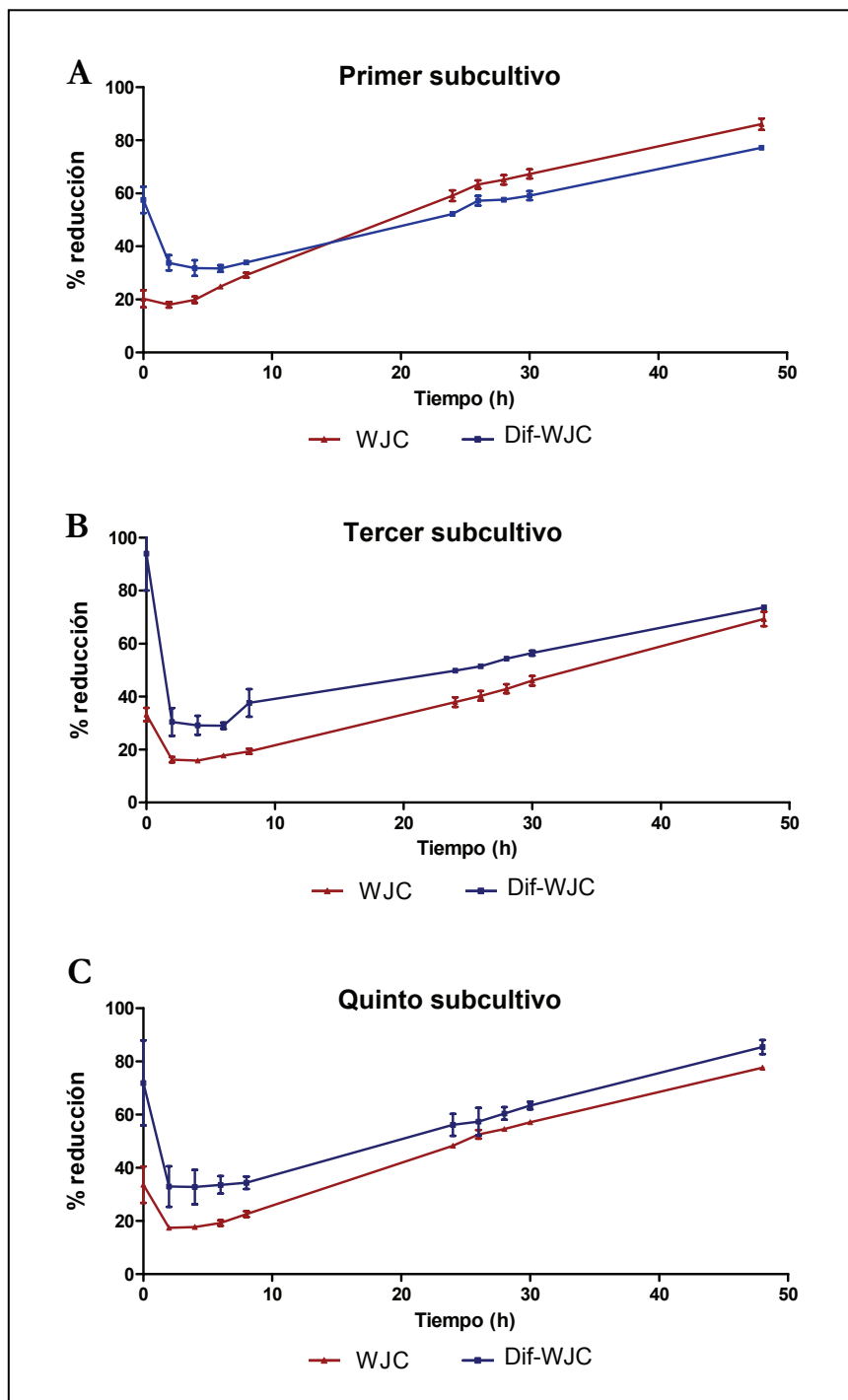


Figura 30: Viabilidad de WJC y Dif-WJC cuantificada por el método del AlamarBlue® en los subcultivos (A) primero, (B) tercero y (C) quinto. Se observa que las células necesitan un periodo de aproximadamente 2 h para aclimatarse al nuevo medio ambiente. Una vez aclimatadas, WJC y Dif-WJC muestran niveles de viabilidad semejantes en todos los subcultivos analizados.

3.3.7 Inmunofenotipo de WJC y Dif-WJC

Llevamos a cabo análisis mediante citometría de flujo para determinar si las WJC presentan un inmunofenotipo mesenquimal, y para valorar si el proceso de diferenciación endotelial hace que se modifique el fenotipo en las Dif-WJC. Para ello, analizamos tres marcadores de superficie íntimamente relacionados con las células mesenquimales: CD105, CD146 y CD90 como marcadores positivos, y un marcador de la línea hematopoyética, CD45, que ha de ser negativo en este tipo de células mesenquimales.

Al analizar las WJC del cultivo primario, comprobamos que éstas presentan un marcaje positivo para los tres marcadores, entre los cuales destaca la positividad para CD90. Del mismo modo, las células se muestran negativas para el marcador hematopoyético CD45 [figura 31]. Estos resultados indican que las WJC del cultivo primario presentan, aparentemente, un fenotipo mesenquimal.

En los sucesivos subcultivos, se comprueba que las WJC mantienen un fenotipo negativo para CD45 y positivo para CD90. Sin embargo, la expresión de los marcadores CD105 y CD146 va disminuyendo gradualmente, hasta volverse negativos en el quinto subcultivo [figura 31].

Cuando analizamos las Dif-WJC, comprobamos que el fenotipo de esta estirpe celular se modifica más rápidamente que en el caso de las WJC, ya que estas células presentan un marcaje de CD105 y CD146 muy escaso desde el primer subcultivo, y la expresión de CD90 es ligeramente menor en comparación con las WJC. Como en el caso anterior, no hay expresión del marcador hematopoyético CD45 en ninguno de los subcultivos analizados [figura 32].

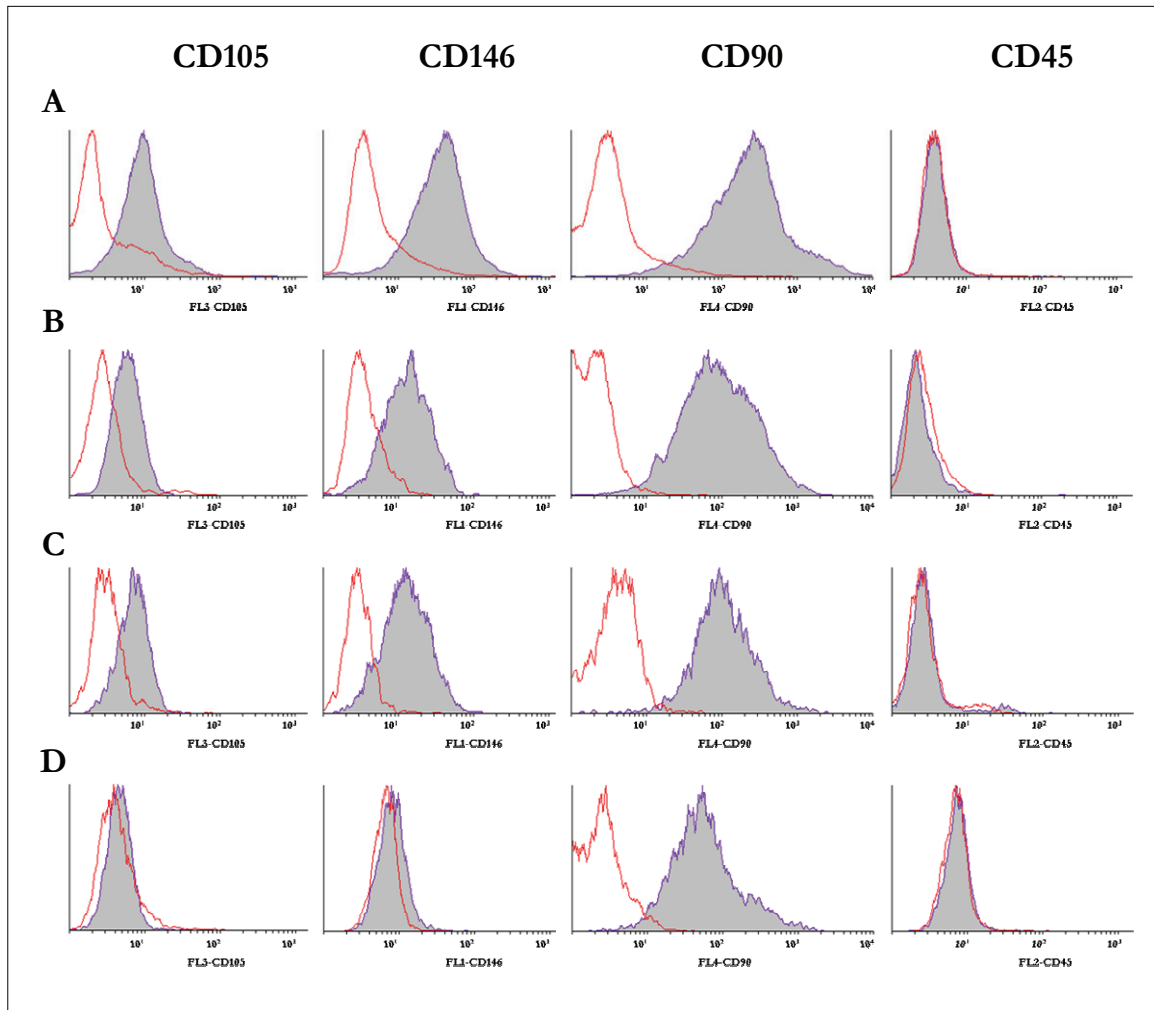


Figura 31: Inmunofenotipo de WJC en cultivo primario, primer, tercer y quinto subcultivo. El pico perfilado en rojo se corresponde con el control de isotipo, y el pico gris perfilado en morado es la expresión de las muestras analizadas para cada marcador. **(A)** Las WJC del cultivo primario presentan un fenotipo mesenquimal, con marcaje positivo para CD105, CD146 y CD90. **(B)** En el primer subcultivo se aprecia una disminución en la expresión de CD105 y CD146. **(C)** Esta disminución continúa patente en el tercer subcultivo. **(D)** En el quinto subcultivo, las WJC son negativas para CD105 y CD146, manteniendo la positividad para CD90. El marcador de la línea hematopoyética, CD45, está ausente en todos los subcultivos analizados.

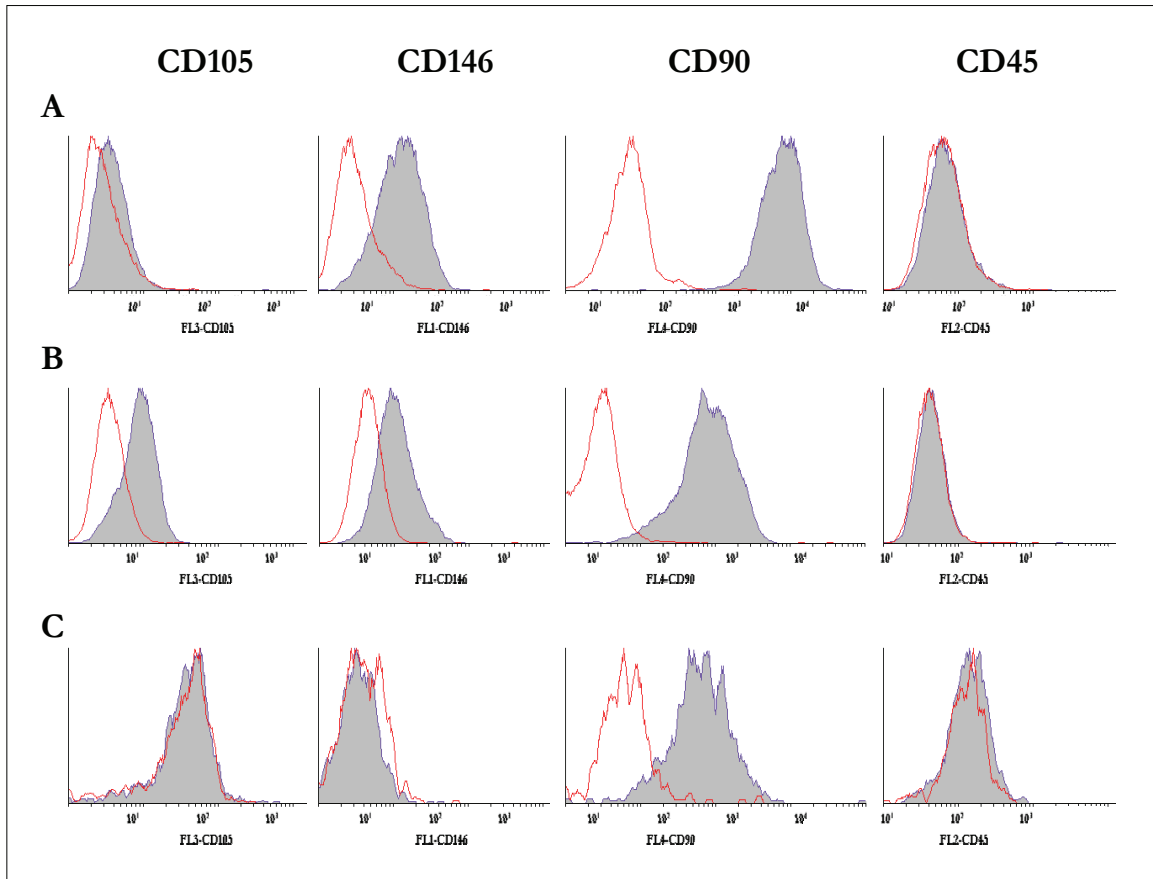


Figura 32: Inmunofenotipo de Dif-WJC en primer, tercer y quinto subcultivo. El pico perfilado en rojo se corresponde con el control de isotipo, y el pico gris perfilado en morado es la expresión de las muestras analizadas para cada marcador. Al igual que las WJC, estas células no expresan el marcador de la línea hematopoyética CD45 en ninguno de los subcultivos analizados. **(A)** El fenotipo de las Dif-WJC se modifica rápidamente con respecto al cultivo primario, y ya en el primer subcultivo se observa una marcada disminución en la expresión de CD105 y CD146. **(B)** En el tercer subcultivo, las células son prácticamente negativas para estos marcadores, manteniendo únicamente la expresión positiva para CD90. **(C)** En el quinto subcultivo, las células ya no expresan CD105 ni CD146.

3.3.8 Estudios de inmunofluorescencia

Con el fin de caracterizar el fenotipo de las poblaciones celulares HUVEC, WJC y Dif-WJC, llevamos a cabo una serie de análisis mediante técnicas de inmunofluorescencia (IF) para detectar la presencia o ausencia de determinadas proteínas específicas de las líneas endotelial y mesenquimal.

Teniendo en cuenta que el fenotipo de las HUVEC varía sustancialmente entre el cultivo primario y el quinto subcultivo, como se describió en los apartados anteriores, realizamos la caracterización de esta población utilizando células procedentes del primer subcultivo. Estas células presentan un fenotipo endotelial, con marcaje positivo para la proteína de unión endotelial CD31, la proteína de la línea hematopoyética CD34 y la glicoproteína del factor von Willebrand (vWF) [figura 33].

Las células endoteliales tienen la capacidad de interactuar con el VEGF para llevar a cabo los procesos de angiogénesis y vasculogénesis. Esta interacción se lleva a cabo a través de los receptores del VEGF (VEGFR). Los cultivos analizados muestran que las HUVEC presentan en su membrana citoplasmática una ligera expresión positiva para VEGFR de tipo 1 y 2, que son Flt-1 y KDR respectivamente [figura 34]. El porcentaje de células positivas para KDR en cultivos de HUVEC es de aproximadamente 64%; este valor es considerablemente mayor que el de Flt-1, cuyo porcentaje de células positivas no alcanza el 30%.

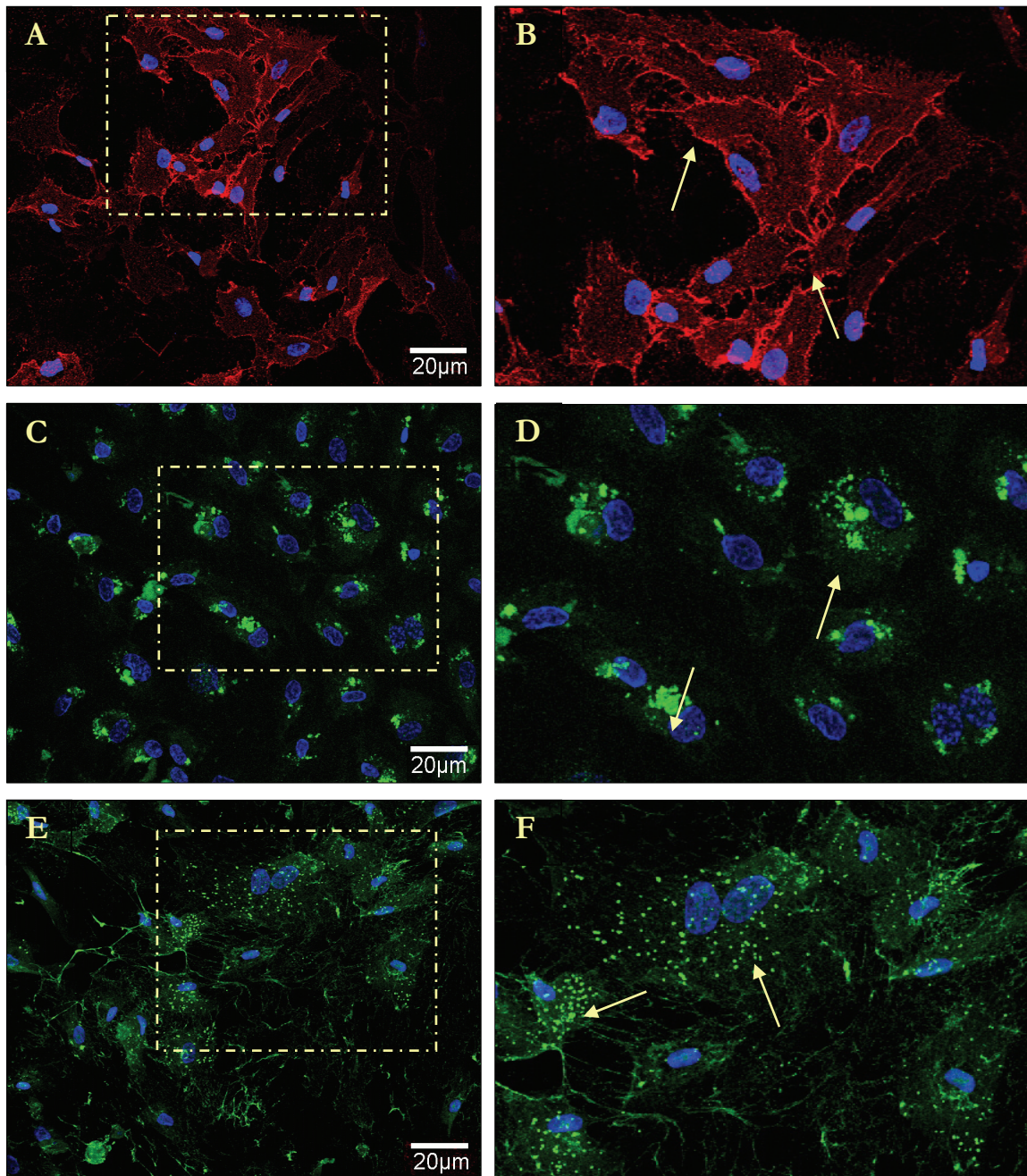


Figura 33: Expresión de los marcadores específicos de la línea endotelial en cultivos de HUVEC del primer subcultivo. **(A)** Marcaje de la proteína de unión celular CD31. **(B)** Ampliación de la zona recuadrada en A (---) donde se aprecia el marcaje positivo en las zonas de unión celular (→). **(C)** Marcaje de la proteína CD34. **(D)** Ampliación de la zona recuadrada en C (---) donde se aprecia el marcaje positivo en el citoplasma celular (→). **(E)** Marcaje de la glicoproteína vWF. **(F)** Ampliación de la zona recuadrada en E (---) donde se aprecia el marcaje positivo en el citoplasma celular (→). Imágenes tomadas con un microscopio láser confocal (IF, todas las imágenes a 400 aumentos).

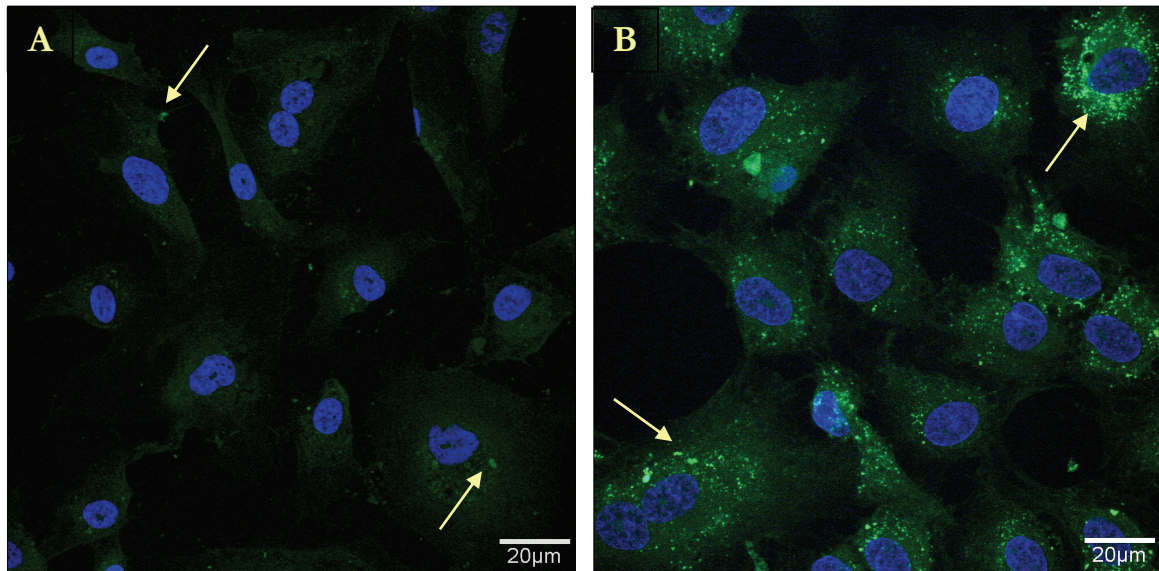


Figura 34: Expresión de Flt-1 y KDR en cultivos de HUVEC del primer subcultivo. **(A)** Estas células tienen un escaso marcaje positivo para el receptor Flt-1 (VEGFR-1) (→). **(B)** Sin embargo, presentan una mayor expresión para el receptor KDR (VEGFR-2) (→). (IF, ambas imágenes a 630 aumentos).

Las HUVEC muestran un citoesqueleto bien organizado, con presencia de filamentos de vimentina y α -tubulina en el 100% de la población celular [figura 35]. Dada la naturaleza endotelial de estas células, el citoplasma de las HUVEC no presenta filamentos de desmina ni α -actina, proteínas muy características de células musculares [figura 35].

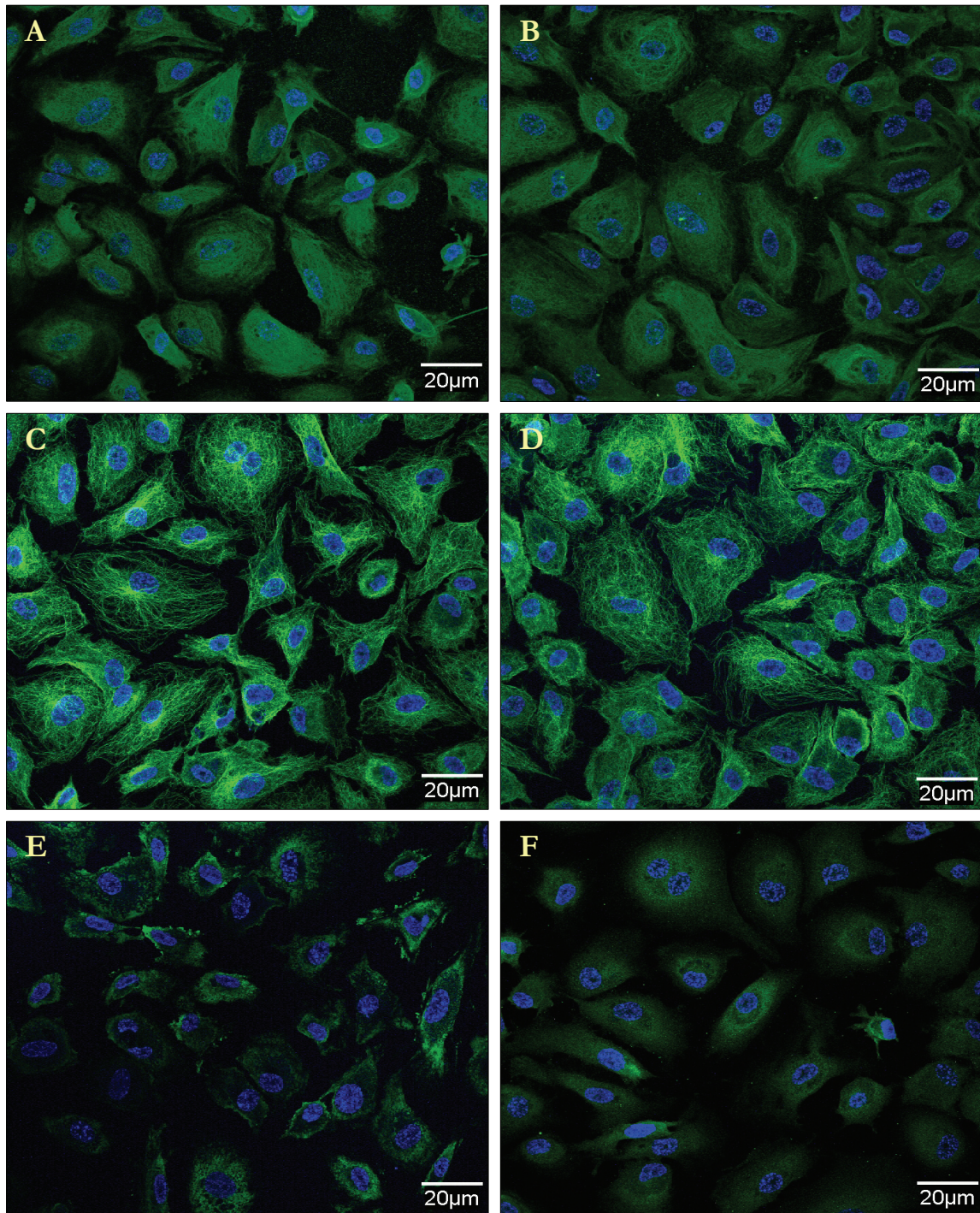


Figura 35: Expresión de proteínas constitutivas del citoesqueleto en cultivos de HUVEC. (A, B) El 100% de la población celular muestra presencia de vimentina y (C, D) α -tubulina. (E) Sin embargo, las HUVEC no presentan en su citoplasma filamentos de α -actina ni (F) desmina (IF; todas las imágenes a 400 aumentos).

Para caracterizar la población de WJC, analizamos la expresión de una serie de proteínas relacionadas con el fenotipo mesenquimal, tales como: CD9 (proteína moduladora de la migración y adhesión celular), E-cadherina (implicada en el crecimiento y desarrollo celular, así como en el mantenimiento de la integridad tisular), podocalixina (PODXL; implicada en la regulación de la adhesión y la morfología celular) y el factor de transcripción Oct-3/4 (implicado en los procesos de autorrenovación y mantenimiento de la indiferenciación de células madre).

El fenotipo de las WJC en cultivo es ligeramente mesenquimal, ya que en todos los subcultivos estudiados, las células muestran expresión positiva para estos marcadores, aunque ninguno de ellos se expresa en el total de la población celular. En el quinto subcultivo, las WJC presentan un leve marcaje para CD9, con un porcentaje de expresión que no alcanza el 20%. En el caso de PODXL, la expresión positiva es más moderada y se aprecia en casi la mitad de la población. Finalmente, la proteína E-cadherina y el factor de transcripción Oct-3/4 se expresan en más del 80% de la población celular [figura 36].

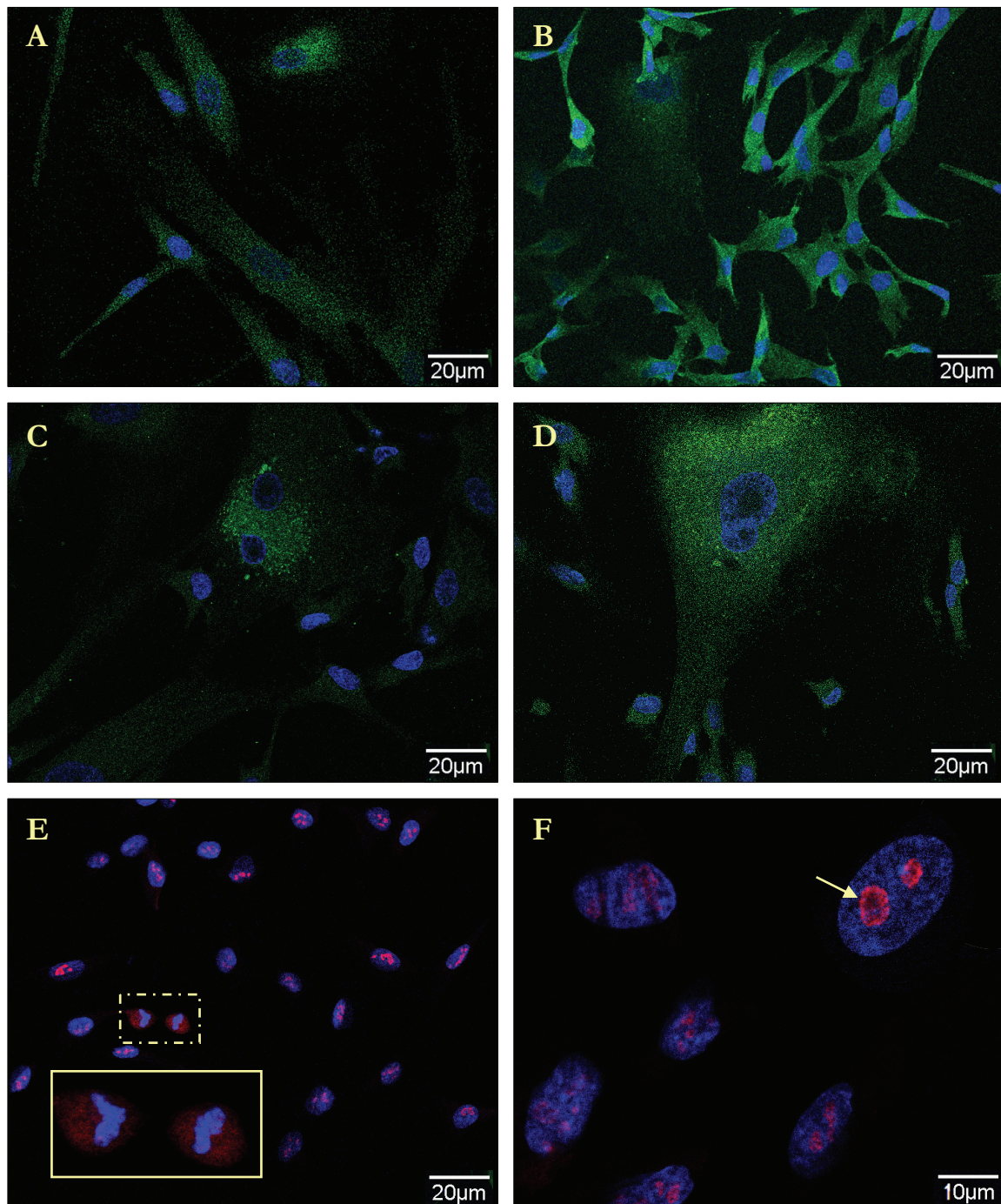


Figura 36: Expresión de proteínas relacionadas con fenotipo mesenquimal en cultivos de WJC del quinto subcultivo. **(A)** Expresión de CD9 (IF, 400 aumentos). **(B)** Expresión de E-cadherina (IF, 400 aumentos). **(C, D)** Expresión de PODXL (IF, 400 aumentos). **(E, F)** Expresión de Oct-3/4. Se puede apreciar que el marcaje intranuclear aparece bien definido en las células en interfase (\rightarrow), y totalmente desorganizado en las células en división mitótica (---- y ampliación) (IF, 400 y 1.350 aumentos respectivamente).

Las WJC no muestran expresión alguna para los marcadores específicos de la línea endotelial CD31, CD34 y vWF. Además, los receptores 1 y 2 del VEGF no se expresan en gran cantidad en esta estirpe celular, ya que apenas el 15% de la población de WJC es positiva para el receptor Flt-1, y el 7% lo es para el receptor KDR [figura 37].

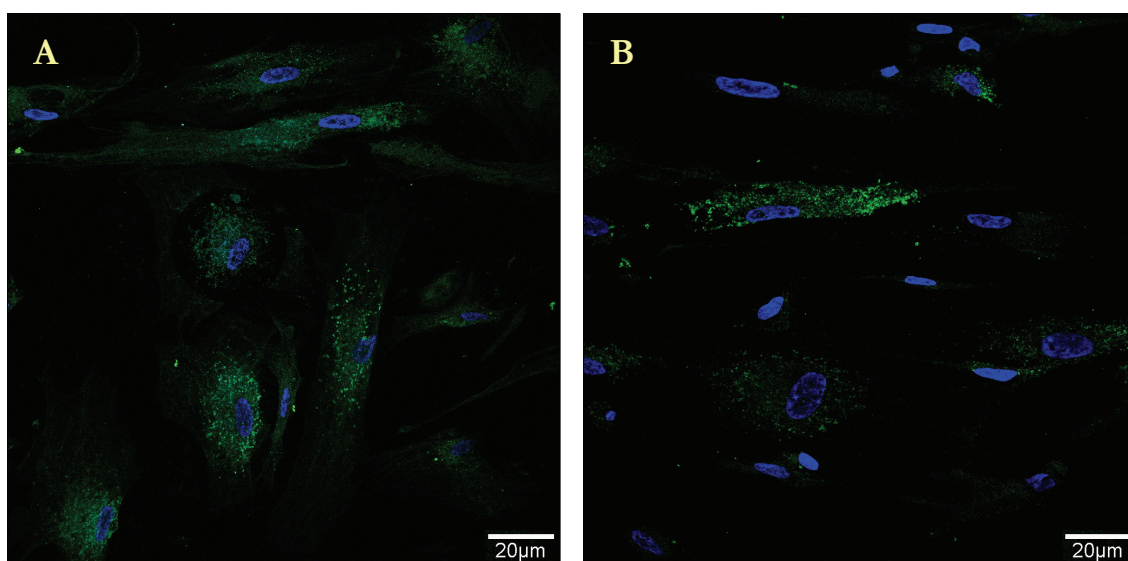


Figura 37: Expresión de Flt-1 y KDR en cultivos de WJC del quinto subcultivo. **(A)** Expresión del receptor Flt-1 (VEGFR-1). **(B)** Expresión del receptor KDR (VEGFR-2) (IF, ambas imágenes a 630 aumentos).

El citoplasma de las WJC presenta filamentos de vimentina y α -tubulina bien organizados. Curiosamente, un porcentaje de esta población muestra además expresión positiva para filamentos de α -actina de músculo liso y desmina, confirmando el fenotipo fibroblastoide de esta estirpe celular [figura 38].

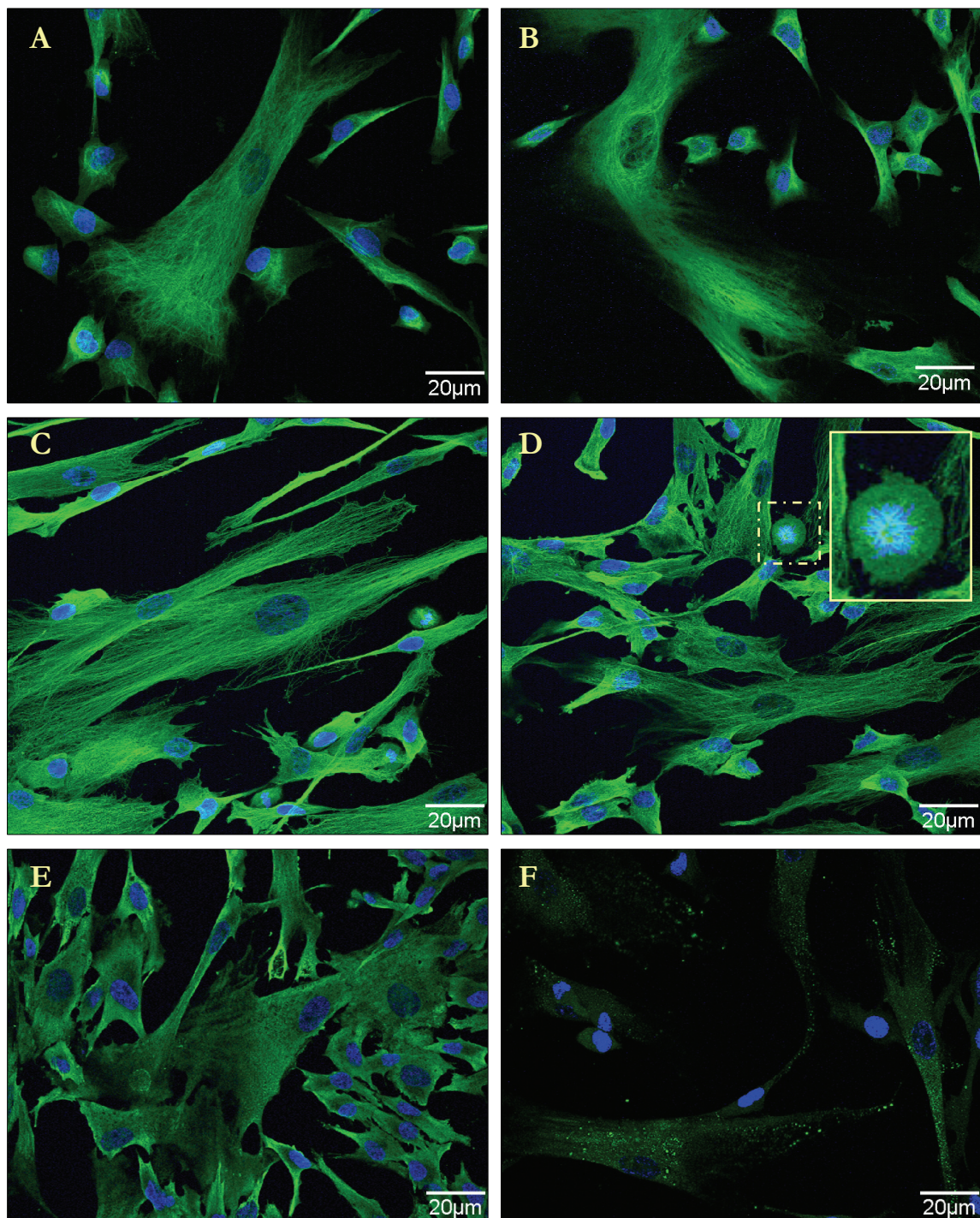


Figura 38: Expresión de proteínas constitutivas del citoesqueleto en cultivos de WJC del primer subcultivo. (A, B) Población positiva para vimentina y (C, D) α -tubulina. Se puede observar la reorganización de los filamentos de α -tubulina en una célula en división (----). (E) Las WJC presentan también filamentos de α -actina. (F) Un porcentaje de la población es positiva para desmina. (IF, todas las imágenes a 400 aumentos).

Finalmente, caracterizamos la estirpe celular diferenciada, Dif-WJC, comparando su fenotipo con los observados en WJC y HUVEC.

La expresión de CD9, E-cadherina, PODXL y Oct-3/4 que presentan las Dif-WJC es muy semejante al observado en la población indiferenciada, WJC. Aunque los porcentajes de expresión positiva disminuyen ligeramente en todos estos marcadores, estas diferencias únicamente alcanzan niveles estadísticamente significativos en el caso de CD9, de manera que se podría sugerir que las Dif-WJC mantienen un fenotipo mesenquimal al menos durante los primeros 5 subcultivos [figura 39].

En líneas generales, las proteínas del citoesqueleto estudiadas muestran una disposición muy semejante en las Dif-WJC en comparación con las células indiferenciadas. Las Dif-WJC presentan filamentos de vimentina, α -tubulina, α -actina de músculo liso y desmina [figura 40]. En el caso concreto de la desmina, resulta llamativo comprobar que el porcentaje de células positivas para esta proteína, así como su intensidad, es notablemente mayor en las Dif-WJC en comparación con la estirpe celular indiferenciada, WJC [figura 41].

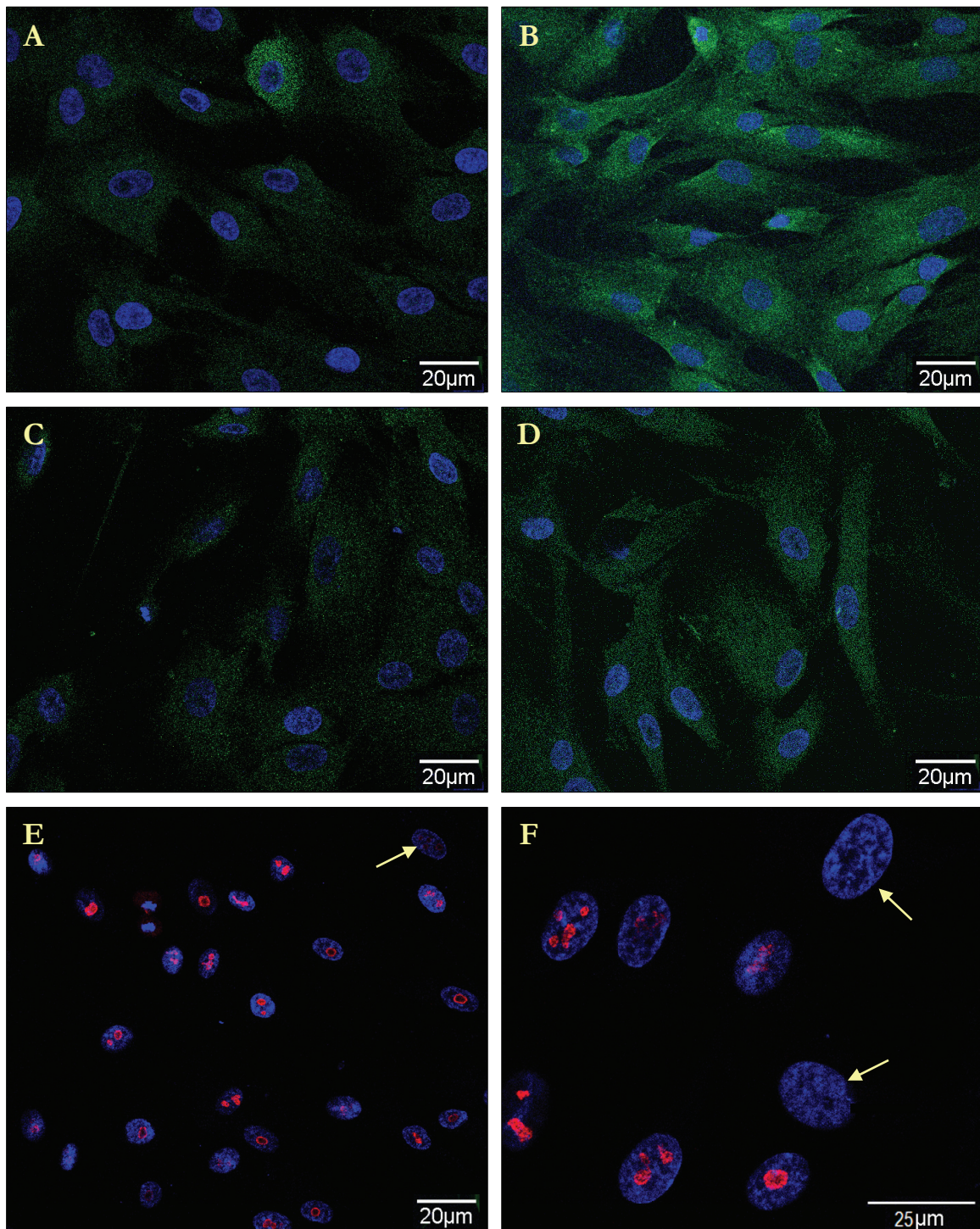


Figura 39: Expresión de proteínas relacionadas con fenotipo mesenquimal en cultivos de Dif-WJC del quinto subcultivo. **(A)** Expresión de CD9 (IF, 400 aumentos). **(B)** Expresión de E-cadherina (IF, 400 aumentos). **(C, D)** Expresión de PODXL (IF, 400 aumentos). **(E, F)** Expresión de Oct-3/4. Se pueden apreciar células negativas para este marcador (→) (IF, 400 y 1.000 aumentos respectivamente).

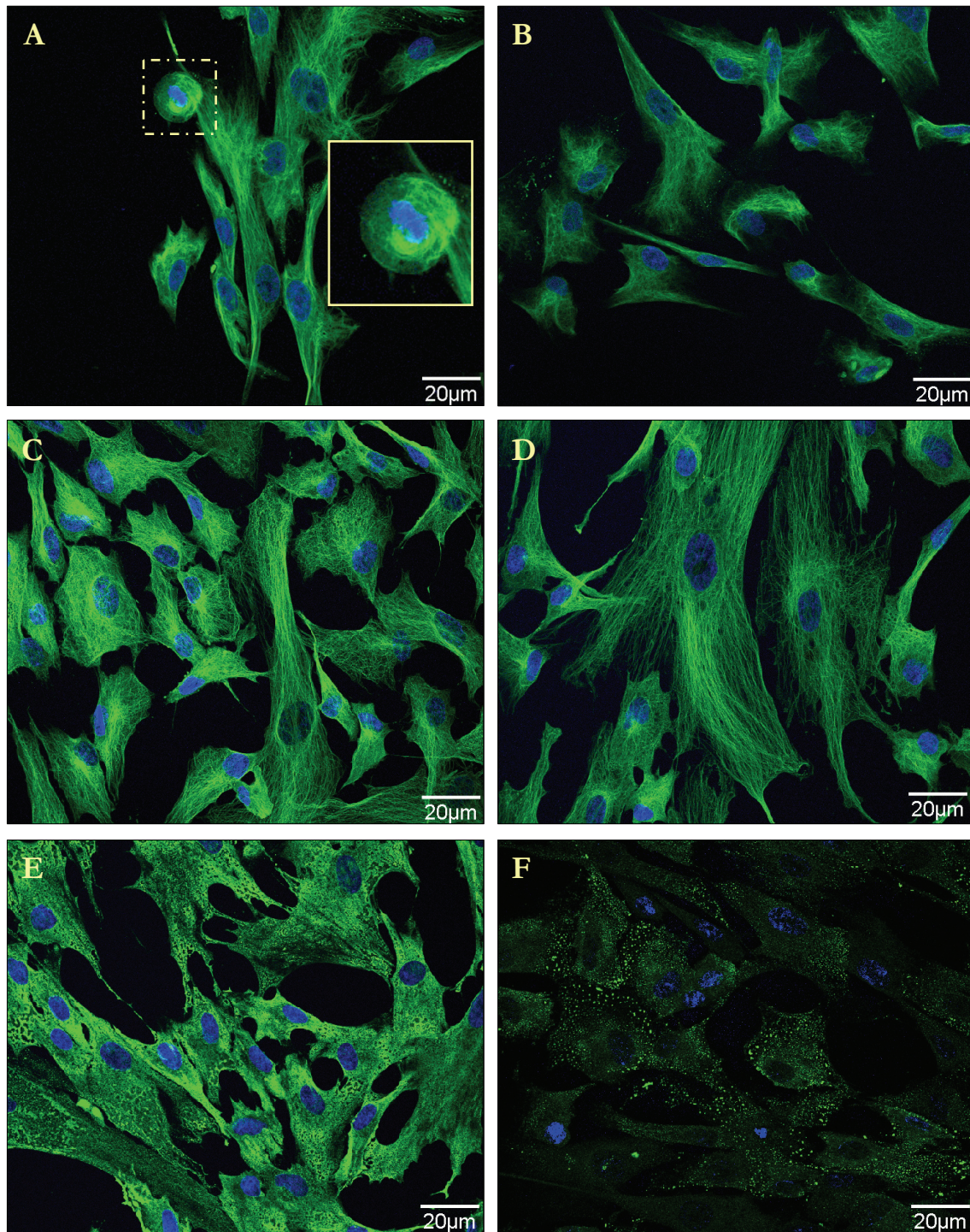


Figura 40: Expresión de proteínas constitutivas del citoesqueleto en cultivos de Dif-WJC del primer subcultivo. **(A, B)** Esta población presenta filamentos de vimentina y **(C, D)** α -tubulina. Se puede observar la reorganización de los filamentos de vimentina en una célula en división (----). **(E)** Las Dif-WJC presentan también α -actina de músculo liso y **(F)** desmina. (IF, todas las imágenes a 400 aumentos).

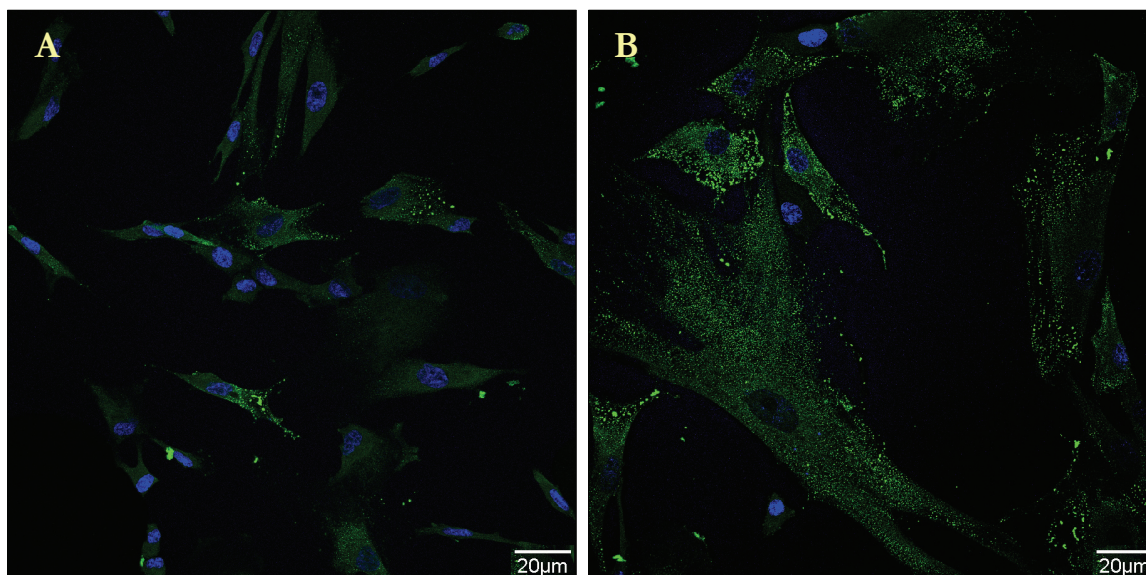


Figura 41: Expresión de desmina en células de la gelatina de Wharton. El marcaje de esta proteína es significativamente mayor en las células diferenciadas hacia la línea endotelial. **(A)** WJC y **(B)** Dif-WJC (IF, todas las imágenes a 400 aumentos).

En cuanto a la diferenciación endotelial comprobamos que las Dif-WJC, a lo largo de los cinco subcultivos estudiados, no muestran un marcaje positivo evidente para ninguno de los marcadores específicos de la línea endotelial CD31, CD34 y vWF. El porcentaje de células positivas para estos tres marcadores ronda el 1% [figura 42]. Al analizar la expresión de los receptores del VEGF, observamos que aproximadamente el 13% de esta población celular es positiva para Flt-1, y tan sólo el 3% lo es para KDR [figura 43]. Estos porcentajes de expresión de los receptores de tipo 1 y 2 del VEGF son ligeramente más bajos a los observados en las células indiferenciadas, WJC.

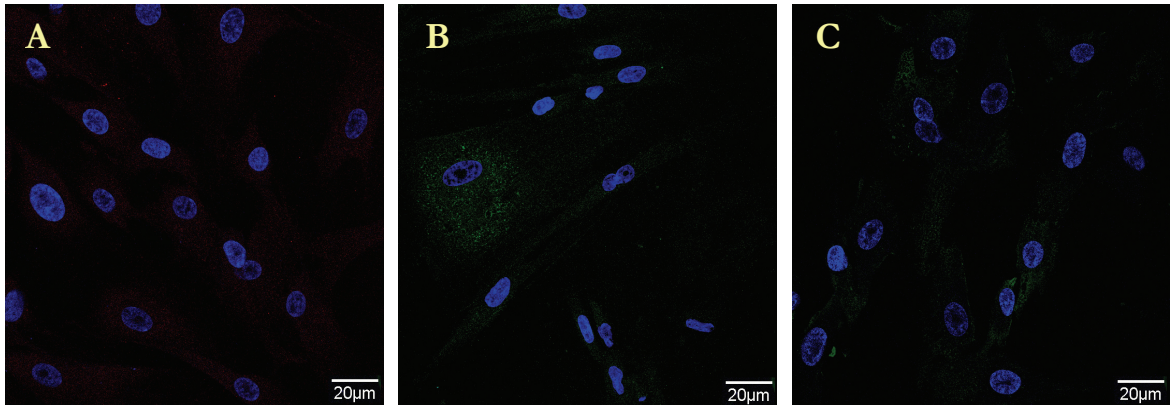


Figura 42: Expresión de marcadores específicos de la línea endotelial en cultivos de Dif-WJC del quinto subcultivo. Tras la inducción de la diferenciación, estas células no muestran marcaje positivo para los marcadores específicos de la línea endotelial (**A**) CD31, (**B**) CD34 y (**C**) vWF (IF, todas las imágenes a 400 aumentos).

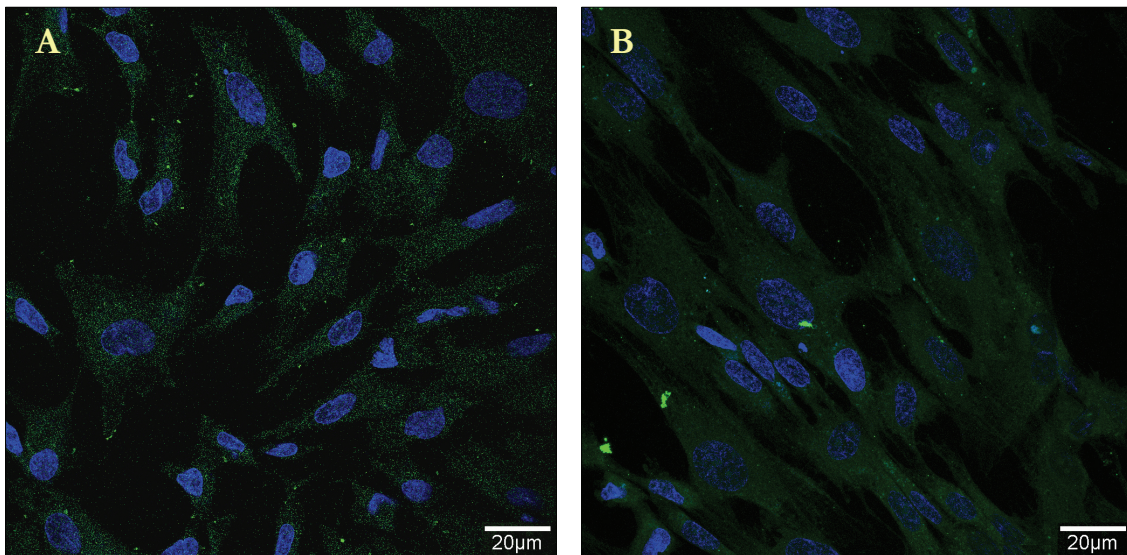


Figura 43: Expresión de Flt-1 y KDR en cultivos de Dif-WJC del quinto subcultivo. (**A**) Expresión del receptor Flt-1 (VEGFR-1). (**B**) Expresión del receptor KDR (VEGFR-2). La mayoría de las células de esta población son negativas para este receptor (IF, ambas imágenes a 630 aumentos).

En la siguiente tabla se resume la expresión media de los anticuerpos estudiados en las distintas estirpes celulares [tabla 7].

Expresión de los distintos anticuerpos estudiados (%)			
Anticuerpo	HUVEC	WJC	Dif-WJC
CD31	71,83 ± 1,7 (‡)	0	1,43 ± 0,2
CD34	74,59 ± 2,9 (‡)	0	1,35 ± 0,6
vWF	67,47 ± 2,5 (‡)	0	1,62 ± 0,4
Flt-1	28,72 ± 2,1 (‡)	14,52 ± 3,2	13,80 ± 2,6
KDR	64,72 ± 1,9 (‡)	7,06 ± 1,2 (‡)	3,61 ± 1,9 (‡)
α-actina	0 (‡)	100	100
α-tubulina	100	100	100
Desmina	0 (‡)	25,12 ± 2,1 (‡)	37,53 ± 0,7 (‡)
Vimentina	100	100	100
CD9	----	16,72 ± 2,2 (‡)	6,3 ± 2,1 (‡)
E-cadherina	----	82,12 ± 2,7	75,3 ± 1,9
PODXL	----	44,41 ± 3,4	30,25 ± 2,6
Oct-3/4	----	87,92 ± 0,9	82,75 ± 2,7

Tabla 7: Expresión media de los anticuerpos estudiados en los cultivos de HUVEC, WJC y Dif-WJC. Los datos corresponden al valor de la media ± desviación típica. (‡) Diferencias significativas de HUVEC con respecto a WJC y Dif-WJC (**p<0,001); (‡) Diferencias significativas entre WJC y Dif-WJC (*p<0,05).

3.3.9 Producción de 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$

El endotelio vascular lleva a cabo numerosas funciones con el fin de mantener la homeostasis en los vasos sanguíneos. Para lograrlo, las células endoteliales producen y liberan sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Una de estas sustancias es la prostaciclina, un agente vasodilatador cuya función principal consiste en prevenir la agregación plaquetar. Para analizar la liberación de prostaciclina es frecuente recurrir al estudio de uno de sus intermediarios más estables: 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$.

Analizamos mediante ELISA la capacidad de HUVEC, WJC y Dif-WJC para liberar 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$ durante los subcultivos primero, tercero y quinto. En la tabla 8 se encuentran detallados los valores medios de la concentración en pg/mL medida para cada grupo de estudio [tabla 8].

Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones de este metabolito secretadas por HUVEC disminuyen de forma gradual con el avance de los subcultivos, presentando diferencias significativas entre la concentración media secretada en los subcultivos primero y quinto (* $p < 0,05$). Las WJC, por el contrario, secretan niveles basales en todos los subcultivos analizados, sin que existan diferencias entre ellos. De igual forma, las Dif-WJC secretan al medio concentraciones basales de 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$, [figura 44].

Al analizar cada subcultivo individualmente, observamos que la secreción de HUVEC durante el primer subcultivo es significativamente mayor que la de WJC (** $p < 0,01$) y Dif-WJC (** $p < 0,001$). En el tercer subcultivo, los niveles de secreción de las HUVEC son significativamente más elevados que en el caso de las Dif-WJC (* $p < 0,05$). En este punto observamos también diferencias entre WJC y Dif-WJC (* $p < 0,05$). Finalmente, en el quinto subcultivo, los niveles de secreción de las HUVEC

han disminuido notablemente, aunque se mantienen en valores más elevados que los otras dos poblaciones celulares, especialmente Dif-WJC (** $p < 0,01$) [figura 45].

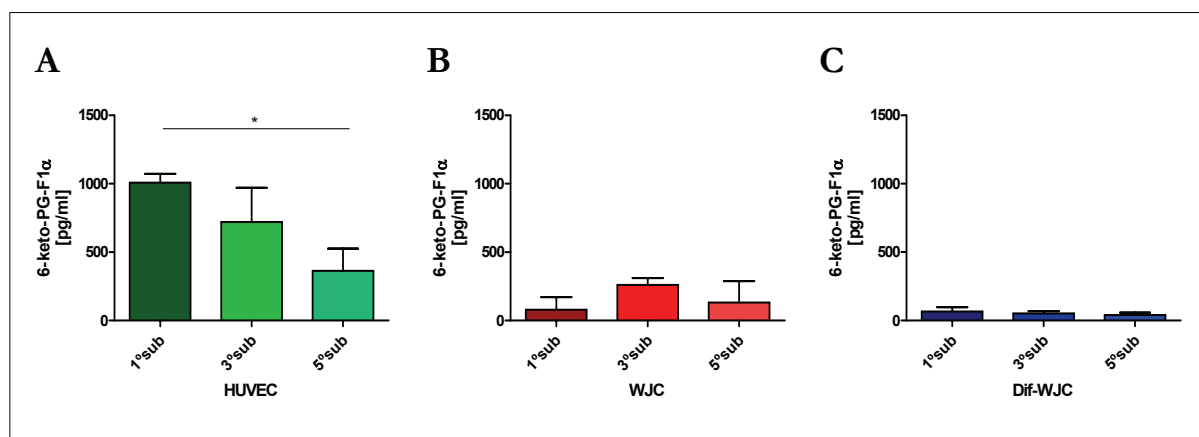


Figura 44: Liberación al medio de 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$ analizado mediante ensayos de ELISA. **(A)** Las HUVEC presentan un patrón de secreción que disminuye gradualmente con el avance de los subcultivos, con diferencias significativas entre el primero y el quinto ($*p < 0,05$). **(B)** Las WJC muestran niveles basales de secreción en todos los subcultivos. **(C)** Las Dif-WJC también secretan niveles basales en todos los tiempos de estudio.

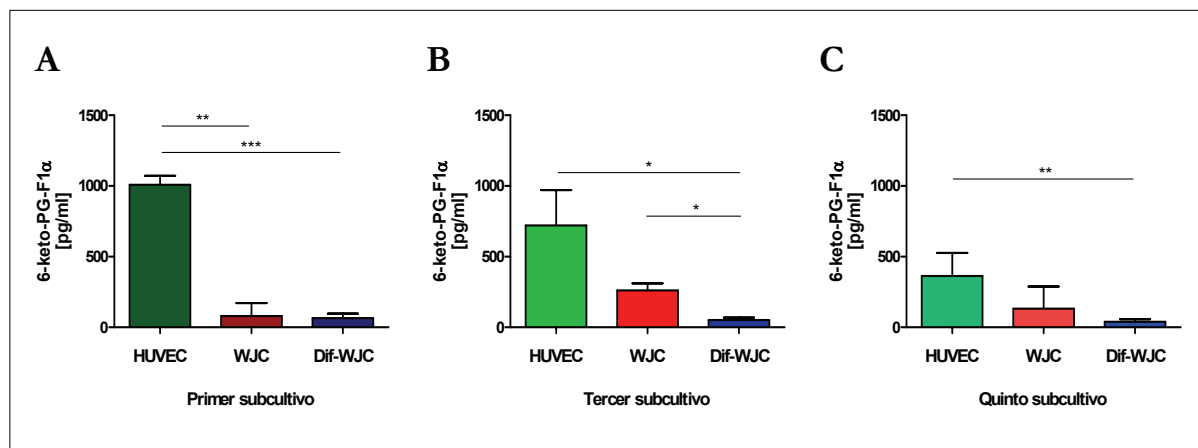


Figura 45: Liberación al medio de 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$ en primer, tercer y quinto subcultivo. **(A)** En el primer subcultivo, la concentración secretada por HUVEC es significativamente mayor que WJC (** $p < 0,01$) y Dif-WJC (** $p < 0,001$). **(B)** En el tercero, las Dif-WJC tienen niveles de secreción significativamente más bajos que HUVEC (* $p < 0,05$) y WJC (* $p < 0,05$). **(C)** En el quinto subcultivo únicamente hay diferencias significativas entre HUVEC y Dif-WJC (** $p < 0,01$).

Grupo de estudio	Valor medio de concentración [pg/mL]
HUVEC primer subcultivo	1.009,4 ± 44,41
HUVEC tercer subcultivo	720,7 ± 144,3
HUVEC quinto subcultivo	363,2 ± 93,45
WJC primer subcultivo	79,10 ± 23,51
WJC tercer subcultivo	260,3 ± 35,70
WJC quinto subcultivo	131,7 ± 30,34
Dif-WJC primer subcultivo	66,06 ± 17,72
Dif-WJC tercer subcultivo	52,00 ± 11,41
Dif-WJC quinto subcultivo	38,90 ± 9,05

Tabla 8: Valores medios de la concentración de 6-ketoprostaglandina- $F_{1\alpha}$ liberada al medio de cultivo por las células. En la tabla se representa el valor medio \pm desviación típica.

3.3.10 Expresión génica

Una de las características que presentan las células mesenquimales es la expresión de genes relacionados, tanto con procesos de autorrenovación, como con el mantenimiento de las propiedades de pluripotencialidad o multipotencialidad. Los factores de transcripción Nanog, Oct-4 y SOX2 se expresan en este tipo de células, constituyendo un marcador adecuado para las células de tipo mesenquimal. Mediante técnicas de qRT-PCR analizamos la expresión del RNA mensajero (mRNA) para los genes Nanog, Oct-4 y SOX2, utilizando cultivos de WJC y Dif-WJC en cultivo primario (sólo WJC) y subcultivos primero, tercer y quinto.

De los tres factores de transcripción estudiados, Nanog es el que presenta una mayor expresión tanto en WJC como en Dif-WJC. Este gen está expresado en las dos poblaciones celulares, de forma que al analizar los cultivos de WJC comprobamos que

Nanog incrementa ligeramente su expresión entre el cultivo primario y el primer subcultivo, y con el avance de los subcultivos esta expresión va decayendo hasta el quinto subcultivo, momento en el que observamos diferencias significativas en los niveles de expresión con respecto al primer subcultivo (** $p < 0,01$). En el caso de las Dif-WJC también se observa una disminución gradual en los niveles de expresión de este gen a medida que avanzan los subcultivos [figura 46]. La expresión de Oct-4 en las WJC se mantiene similar entre el cultivo primario y el quinto subcultivo. Curiosamente, los niveles de expresión de este factor de transcripción en las Dif-WJC se reduce aproximadamente un 50% entre el primer y el tercer subcultivo (* $p < 0,05$), y a partir de este momento se estabiliza, mostrando en el quinto subcultivo niveles similares a los observados en el tercer subcultivo [figura 46]. Finalmente, SOX2 presenta unos niveles de expresión muy bajos en ambas estirpes celulares. Las WJC mantienen una expresión basal a lo largo de todos los subcultivos, sin embargo, las Dif-WJC dejan de expresar este factor de crecimiento en algún momento entre el tercer y el quinto subcultivo (* $p < 0,05$) [figura 46].

Con el fin de evaluar la efectividad de la diferenciación endotelial, analizamos la expresión de los genes relacionados con funciones endoteliales, CD31, CD34 y vWF, estudiados previamente por inmunofluorescencia. Además, evaluamos la expresión del gen que codifica la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), involucrada en la regulación de la función vascular. Comparamos la expresión de estos marcadores en WJC y Dif-WJC con un grupo control formado por HUVEC del primer subcultivo.

Al analizar los resultados, observamos que los valores de expresión de los cuatro genes evaluados son significativamente más elevados en HUVEC que en WJC y Dif-WJC (** $p < 0,001$) [figura 47].

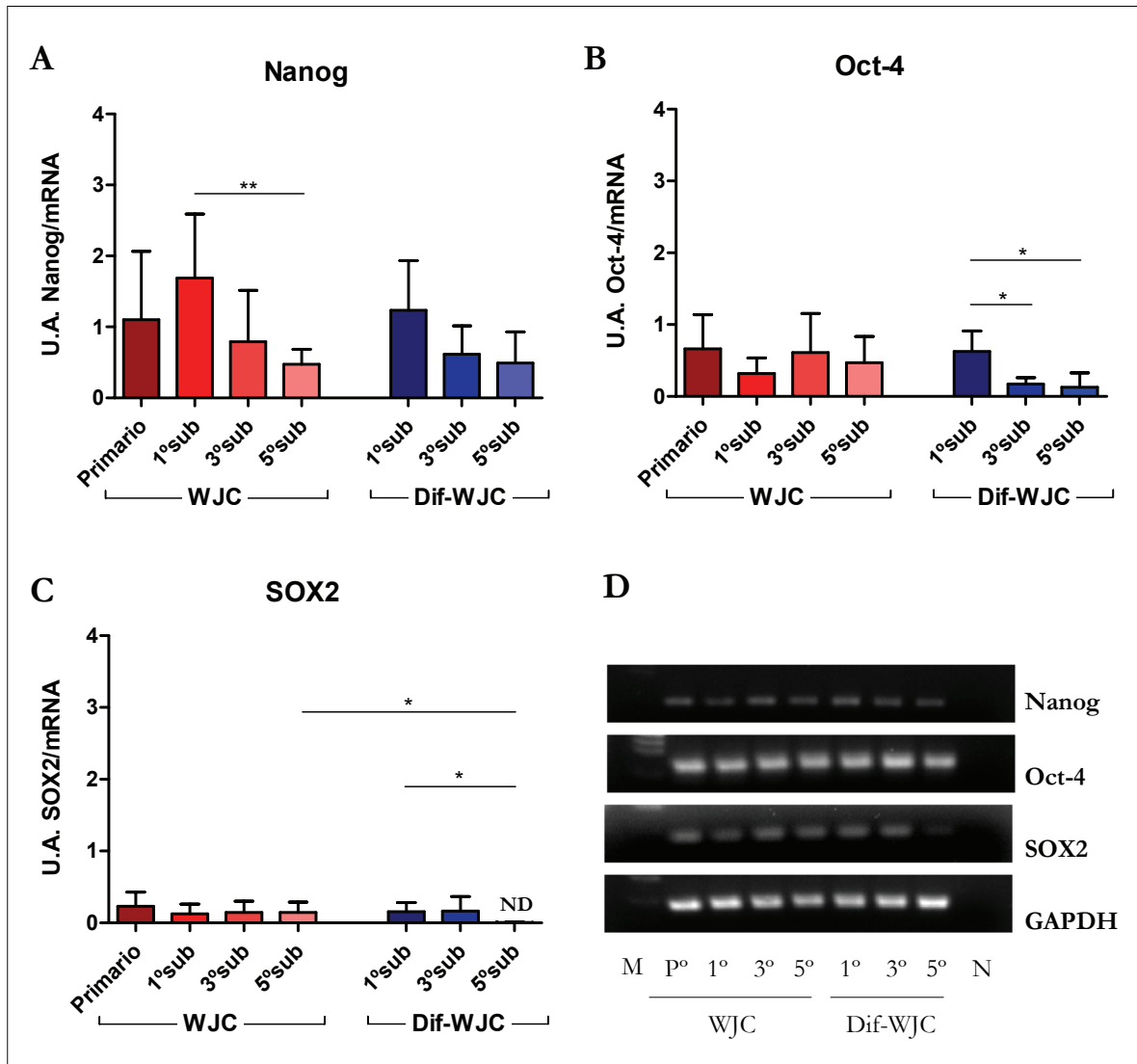


Figura 46: Expresión de los factores de transcripción Nanog, OCT-4 y SOX2 en cultivos de WJC y Dif-WJC. **(A)** En las dos estirpes celulares, la expresión de Nanog disminuye gradualmente a partir del primer subcultivo, alcanzando valores significativamente más bajos entre el primer y el quinto subcultivo de WJC (** $p < 0,01$). **(B)** La expresión de Oct-4 se mantiene constante a lo largo de los subcultivos en las WJC, pero en las Dif-WJC se observa un 50% de disminución de la expresión entre el primer y el tercer subcultivo ($*p < 0,05$), manteniéndose entre el tercer y el quinto subcultivo. **(C)** SOX2 tiene niveles basales de expresión en las WJC a lo largo de todos los subcultivos. En las Dif-WJC la expresión de este gen desaparece entre el tercer y el quinto subcultivo ($*p < 0,05$). **(D)** Gel de agarosa. M = Marcadores de pares de bases; N = Control negativo; ND = No detectable; U.A. = Unidades arbitrarias de expresión.

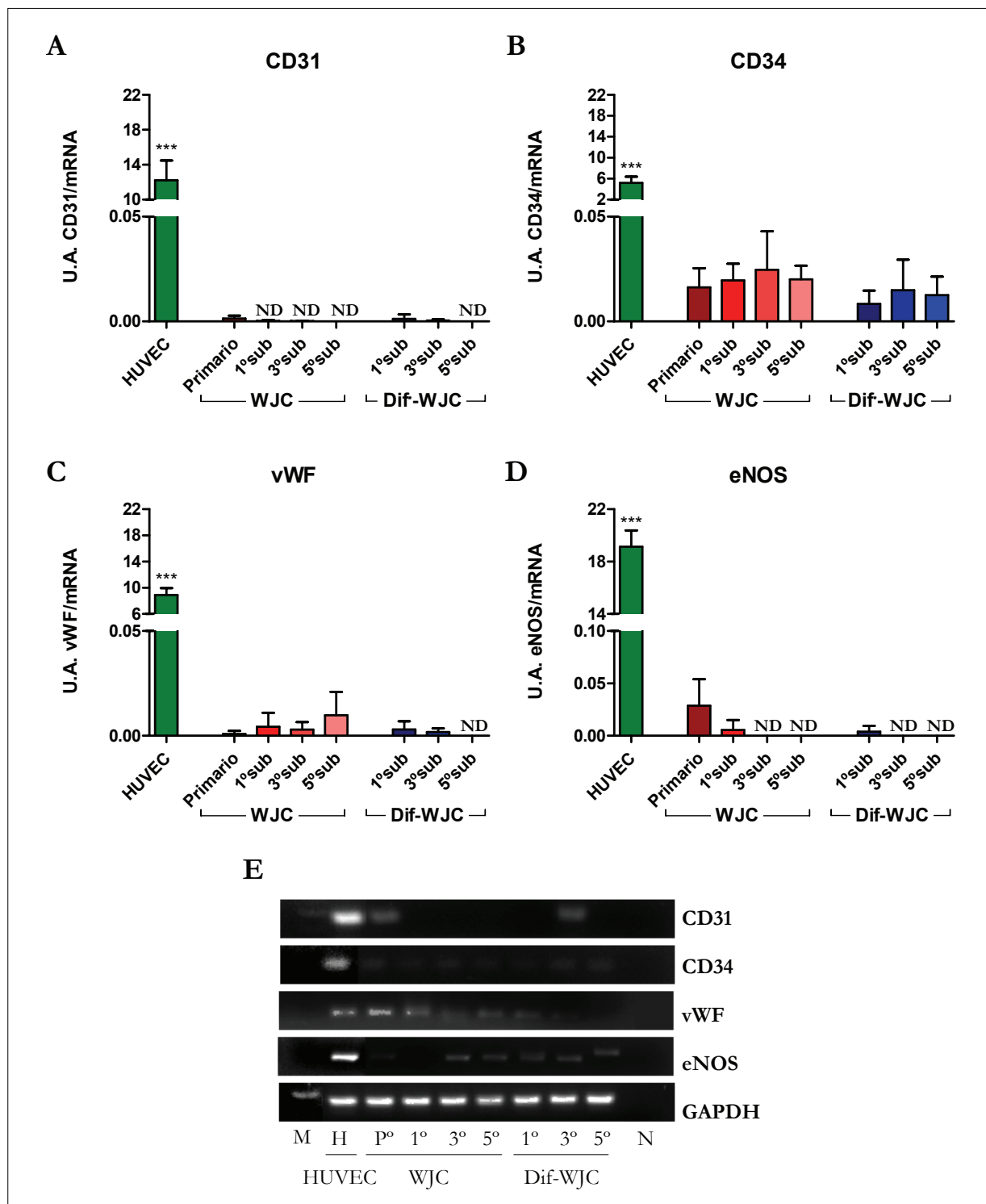


Figura 47: Expresión de los genes CD31, CD34, vWF y eNOS relacionados con funciones endoteliales en cultivos de HUVEC, WJC y Dif-WJC. La expresión de estos genes es extraordinariamente mayor en HUVEC en comparación con WJC y Dif-WJC. **(A)** Expresión de CD31, 2.000 veces superior en HUVEC (**p < 0,001). **(B)** Expresión de CD34, 100 veces superior en HUVEC (**p < 0,001). **(C)** Expresión de vWF, 800 veces superior en HUVEC (**p < 0,001). **(D)** Expresión de eNOS, 400 veces superior en HUVEC (**p < 0,001). **(E)** Gel de agarosa. M = Marcadores de pares de bases; N = Control negativo; ND = No detectable; U.A. = Unidades arbitrarias de expresión.

Finalmente, con el fin de estudiar la capacidad angiogénica de estas estirpes celulares, evaluamos la expresión de los genes que codifican para la síntesis de VEGF y sus receptores de tipo 1 y 2, Flt-1 y KDR.

La expresión del VEGF observada en la población control HUVEC es muy escasa, ya que las células endoteliales son principalmente receptoras de este factor de crecimiento, no productoras. Comparativamente, tanto WJC como Dif-WJC presentan niveles de expresión significativamente mayores con respecto a HUVEC en todos los subcultivos analizamos (** $p < 0,001$). Además, estas dos estirpes tienen una tendencia a reducir la expresión de VEGF a lo largo del tiempo, aunque esta disminución no alcanza diferencias estadísticamente significativas [figura 48].

Al analizar los receptores, comprobamos que los niveles de expresión del Flt-1 son semejantes en las tres estirpes celulares estudiadas, sin que existan diferencias significativas excepto entre el grupo control HUVEC y las Dif-WJC del tercer subcultivo ($p < 0,05$) [figura 48].

La expresión del receptor KDR es significativamente más elevada en las HUVEC, cuyos niveles de expresión son entre 20 y 27 veces más elevados que las WJC y Dif-WJC, respectivamente (** $p < 0,001$). Ambas estirpes WJC y Dif-WJC presentan una disminución gradual en la expresión de este receptor a lo largo de los diferentes subcultivos analizados y aunque sus niveles de expresión son bajos, se pueden apreciar diferencias significativas entre los dos tipos celulares tanto en el primer ($p < 0,05$) como en el quinto subcultivo (** $p < 0,01$). Además, tras analizar individualmente cada una de estas dos estirpes celulares, comprobamos que existen diferencias significativas entre casi todos los subcultivos estudiados [figura 48].

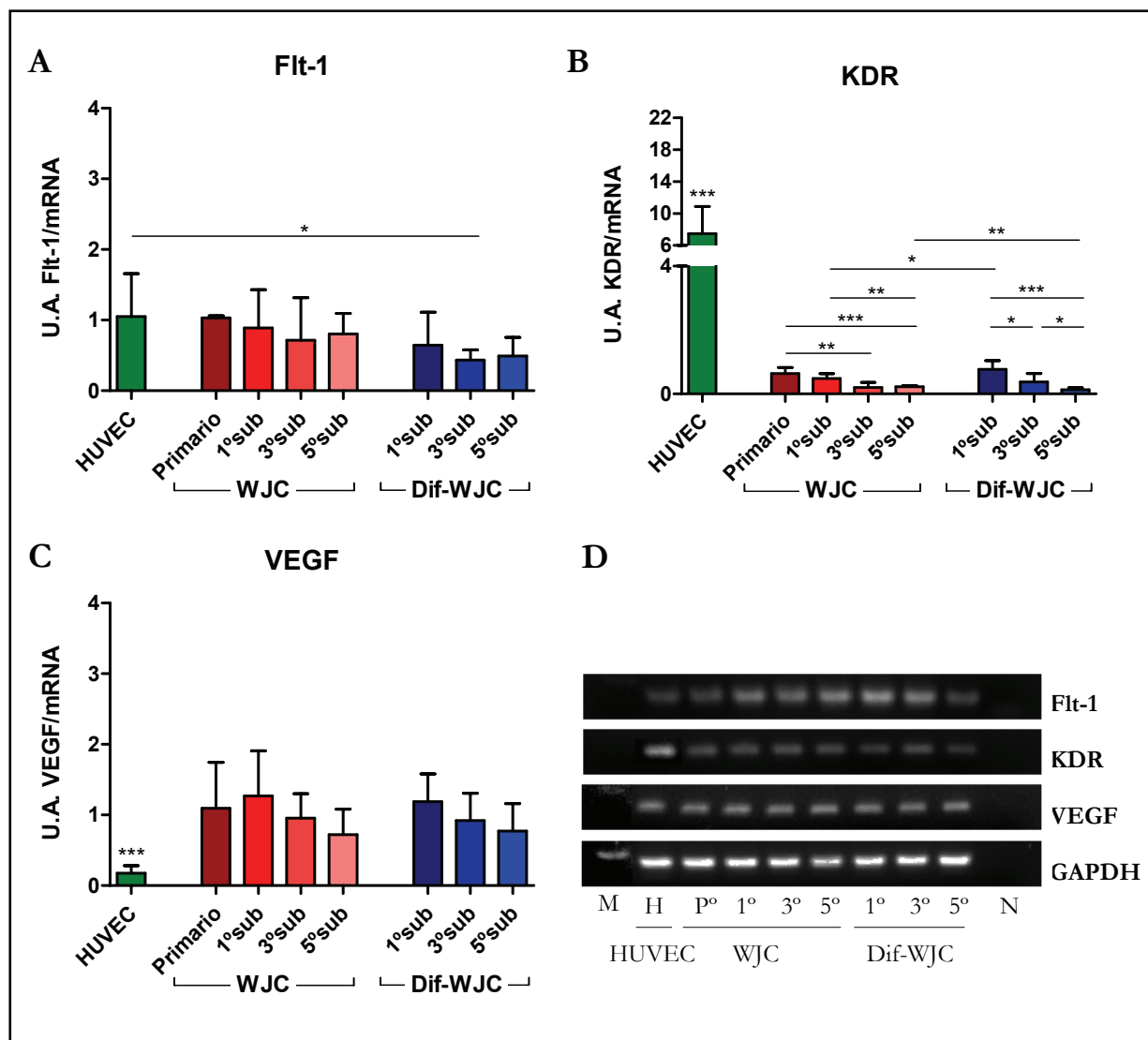


Figura 48: Expresión de los genes del factor de crecimiento VEGF y sus receptores Flt-1 y KDR en cultivos de HUVEC, WJC y Dif-WJC. **(A)** Expresión del receptor Flt-1, con niveles similares entre las tres estirpes celulares y diferencias significativas entre el grupo control y Dif-WJC en tercer subcultivo (* $p < 0,05$). **(B)** Expresión del receptor KDR. Se observa una gran expresión en HUVEC, que es entre 20 y 27 veces mayor que la de WJC y Dif-WJC, respectivamente (** $p < 0,001$). Existen diferencias entre la expresión de WJC y Dif-WJC en primer (* $p < 0,05$) y quinto subcultivos (** $p < 0,01$). **(C)** Expresión de VEGF. El grupo control tiene unos niveles de expresión basales que son significativamente menores que los de WJC y Dif-WJC en todos los subcultivos analizados (** $p < 0,001$). **(D)** Gel de agarosa. M = Marcadores de pares de bases; N = Control negativo; U.A. = Unidades arbitrarias de expresión.

3.3.11 Actividad telomerasa

Tal y como se explicó en el apartado 3.2.9 “Evaluación de la actividad telomerasa”, para que las muestras analizadas se consideren positivas, el valor numérico obtenido de la diferencia entre la absorbancia de cada muestra y la absorbancia de su control negativo ha de ser al menos dos veces superior al valor de la absorbancia del control negativo.

Los resultados obtenidos de los distintos cultivos de HUVEC, WJC y Dif-WJC y evaluados nos indican que ninguna de estas poblaciones presenta actividad telomerasa detectable, ya que los valores obtenidos en cada caso están por debajo de este umbral, cuya relación “ $(M_T - M_{0T})/M_{0T}$ ” se representa en la siguiente tabla [tabla 9]:

Grupo de estudio	$(M_T - M_{0T})/M_{0T}$
HUVEC primer subcultivo	1,216 ± 0,019
WJC primer subcultivo	1,726 ± 0,265
WJC tercer subcultivo	1,011 ± 0,318
WJC quinto subcultivo	0,869 ± 1,144
Dif-WJC primer subcultivo	1,317 ± 0,276
Dif-WJC tercer subcultivo	1,465 ± 0,104
Dif-WJC quinto subcultivo	1,631 ± 0,156

Tabla 9: Valores de la relación obtenida tras calcular la diferencia entre absorbancia de la muestra y su control negativo, y la absorbancia del propio control negativo, representados como el valor medio ± desviación típica.

3.4 RESUMEN DE RESULTADOS OBJETIVO 1

Tras estudiar el comportamiento de las poblaciones celulares de WJC, Dif-WJC y HUVEC en condiciones *in vitro*, podemos destacar los siguientes resultados:

1. Las células de la gelatina de Wharton (WJC) constituyen una población particular, cuyas características morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas presentan rasgos tanto de célula mesenquimal como de célula diferenciada. Estas células tienen además una capacidad de autorrenovación que las mantiene en estado proliferativo tras un periodo de 10 días en cultivo. Sin embargo, durante los primeros cinco subcultivos, las WJC cultivadas en medio AmnioMAX™-C100 pierden gradualmente algunos rasgos mesenquimales, aproximando su fenotipo al de una célula madura.
2. La diferenciación endotelial de las WJC se lleva a cabo mediante el cultivo con medio M199 enriquecido con factor de crecimiento de célula endotelial. La población celular resultante (Dif-WJC) presenta unas evidentes modificaciones fenotípicas y ultraestructurales con respecto a las WJC: su citoplasma incrementa de volumen, se torna filamentoso y las células adoptan una morfología poligonal.
3. A pesar de las modificaciones fenotípicas observadas, bajo nuestras condiciones experimentales, estas células no muestran una diferenciación plenamente funcional hacia la estirpe endotelial. Durante los cinco primeros subcultivos, las Dif-WJC no presentan expresión génica ni proteica de marcadores específicos de la línea endotelial (CD31, CD34, vWF, eNOS). Además, estas células no son capaces de secretar al medio de cultivo un intermediario de la prostaciclina (6-keto-prostaglandina- $F_{1\alpha}$) en concentraciones similares a las producidas por las células endoteliales de vena umbilical (HUVEC).

Tras comprobar que nuestro modelo *in vitro* no supone un estímulo suficiente para diferenciar las WJC hacia células endoteliales funcionales, nos planteamos valorar la capacidad de diferenciación de esta estirpe celular en un modelo *in vivo* de sustitución arterial, en el cual las células estarán sometidas a todos los estímulos, fuerzas mecánicas y señales bioquímicas existentes en el sistema vascular arterial.

Capítulo 4

*Objetivo 2. Modelo
experimental in vivo*

4.1 OBJETIVO 2

Los resultados descritos en el capítulo anterior demuestran que el medio de cultivo M199 enriquecido con factor de crecimiento de célula endotelial provoca en las células de la gelatina de Wharton una diferenciación disfuncional. La carencia de modulación en la expresión génica de marcadores de células endoteliales pudiera ser debido a la ausencia de factores tróficos y mecánicos procedentes del propio flujo sanguíneo. Por este motivo, el objetivo que nos planteamos en el presente capítulo es la evaluación de la capacidad de diferenciación endotelial de las WJC como respuesta a la acción del flujo sanguíneo, para lo cual diseñamos un modelo *in vivo* de sustitución arterial, con el que pretendemos valorar la eficacia de la gelatina de Wharton como fuente alternativa a la obtención de células procedentes del cordón umbilical para aplicaciones de Ingeniería Tisular Vascular.

En primer lugar, diseñaremos un equivalente tisular utilizando un biomaterial vascular de ePTFE cuya superficie luminal esté recubierta con cada una de las distintas estirpes celulares estudiadas (HUVEC, WJC, Dif-WJC). Para la siembra utilizaremos células del primer subcultivo, ya que es con este subcultivo con el que hemos obtenido mejores resultados en los experimentos *in vitro*. Para facilitar la adhesión de las células al biomaterial, éste se preincubará con una solución de fibronectina a concentración 20 µg/mL.

Someteremos los constructos a cultivo bajo condiciones estáticas y dinámicas, con el fin de valorar su eficacia. Posteriormente, los constructos se utilizarán en un modelo *in vivo*, implantándose en la arteria femoral de perros de raza Beagle. La evaluación histológica de los injertos se llevará a cabo tras un tiempo de estudio de 60 días.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Diseño de los equivalentes tisulares

4.2.1.1 Componentes del equivalente tisular o constructo vascular

El diseño de los equivalentes tisulares empleados en el presente trabajo tiene su base en los tres pilares de la Ingeniería Tisular, ya que todos ellos están formados por una combinación de soporte + células + señales. De este modo, los constructos vasculares diseñados contienen los siguientes elementos:

- Soporte: Biomaterial vascular de ePTFE (WL Gore & Associates, Inc, Newark, DE, USA) de 30 μm de porosidad media y 4 mm de diámetro interno [figura 6].
- Fuente celular: Cultivos de HUVEC, WJC y Dif-WJC del primer subcultivo.
- Señal: Recubrimiento de la superficie luminal del biomaterial con una solución de fibronectina (Sigma-Aldrich) a concentración 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La primera evaluación de estos constructos vasculares se realiza con un análisis de su comportamiento *in vitro*, tanto en condiciones estáticas como dinámicas, al interponer el biomaterial en un circuito de flujo pulsátil. Teniendo en cuenta la estirpe celular sembrada en cada constructo, los grupos de estudio serán los siguientes:

1. Grupo I: ePTFE + HUVEC
2. Grupo II: ePTFE + WJC
3. Grupo III: ePTFE + Dif-WJC

Los resultados de los ensayos *in vitro* de los grupos experimentales sembrados con células de la gelatina de Wharton se compararán con el comportamiento de las células endoteliales, que ha sido ampliamente descrito por nuestro Grupo (Bellón y cols., 1992;

Buján y cols., 1992a; Bellón y cols., 1993; Bellón y cols., 1994b; García-Honduvilla y cols., 1995; Bellón y cols., 1997; García-Honduvilla y cols., 2008).

4.2.1.2 Siembra celular en biomaterial plano (sistema estático)

Para realizar la siembra en plano, se abre longitudinalmente una prótesis tubular de ePTFE y se recorta en fragmentos de 1 cm². A continuación, se agujerea la tapa de un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se recorta, recortando también la arandela que sujeta dicha tapa al tubo. Los fragmentos de ePTFE se colocan entonces entre la tapa y la arandela, creando una cámara de siembra cuya base es la superficie luminal del biomaterial. Una vez preparadas las cámaras de siembra, se introducen en una placa multipocillo de 24 pocillos y se esterilizan mediante tratamiento con óxido de etileno.

Para poder llevar a cabo la siembra celular es necesario pretratar la superficie luminal del ePTFE con una solución de fibronectina a concentración 20 µg/mL. Se añaden 100 µL de fibronectina a cada prótesis y se incuban durante 1 h en la estufa de cultivos, a 37 °C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Durante el tiempo de incubación, las células se tripsinizan, centrifugan y cuentan siguiendo la metodología descrita previamente. A continuación, se retira el sobrante de fibronectina y se añade a cada cámara de siembra un volumen de suspensión celular que contenga unas 2,5 x 10⁴ células, completando con el medio de cultivo correspondiente según la estirpe celular, hasta alcanzar un volumen final de 1 mL.

Las cámaras de siembra se introducen en el incubador de cultivos, a 37 °C, con atmósfera de 5% de CO₂ y humedad, renovando el medio de cultivo cada día. Las muestras se recogen en los tiempos de estudio 24 h, 48 h y 7 d. Para recolectar las muestras, una vez finalizado el tiempo de estudio correspondiente, se aspira el medio de cultivo y la cámara de siembra se sumerge en el líquido fijador glutaraldehído al 3%,

para su posterior procesamiento y análisis mediante microscopía electrónica de barrido [figura 49].

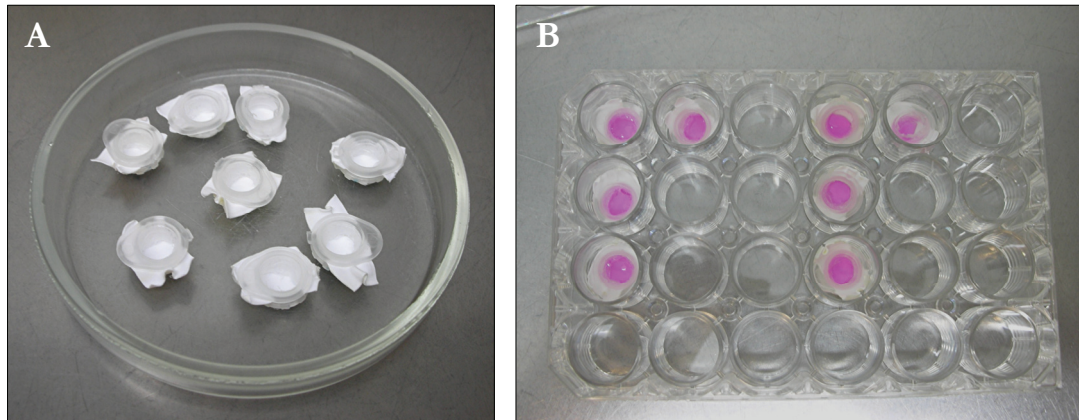


Figura 49: Procesamiento del ePTFE para realizar las siembras celulares en plano. **(A)** Aspecto de las cámaras de siembra antes del pretratamiento con fibronectina. **(B)** Aspecto de las cámaras de siembra una vez realizada la siembra celular.

4.2.1.3 Siembra celular en biomaterial tubular (sistema dinámico)

Para realizar la siembra celular en la superficie luminal de prótesis tubulares, se cortan fragmentos de ePTFE de 6 cm de longitud, y se esterilizan mediante tratamiento con óxido de etileno. Al igual que en la siembra en plano, es necesario diseñar una cámara de siembra adecuada. Para ello, se canula cada uno de los extremos del biomaterial con tubos de plástico de 10 cm de longitud (Nordson Corporation), y se introduce en un recipiente cilíndrico de vidrio de 10 cm de longitud, que tiene tapones roscados en ambos extremos. Los tapones están perforados, facilitando la salida de las cánulas de plástico a través de ellos, y permitiendo así que el biomaterial permanezca correctamente posicionado, lo más recto posible y paralelo a las paredes del recipiente.

Cuando la cámara de siembra está preparada, se acopla una llave de tres vías en cada extremo libre de las cánulas y con ayuda de una jeringuilla Plastipak™ de 2 mL se

inyectan 2 mL de fibronectina a concentración 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta rellenar por completo la luz del biomaterial. A continuación, se cierran ambas llaves para evitar fugas de la fibronectina, y la cámara de siembra se incuba durante 1 h a 37 °C. Dentro del incubador, la cámara de siembra se coloca sobre un dispositivo de fabricación propia denominado “roller”, que está compuesto por un motor conectado a una serie de rodillos que giran a una velocidad constante de 6 rph. Al colocar la cámara de siembra sobre el “roller”, ésta gira, permitiendo que la fibronectina se adhiera de forma homogénea al lumen protésico durante el periodo de incubación [figura 50].

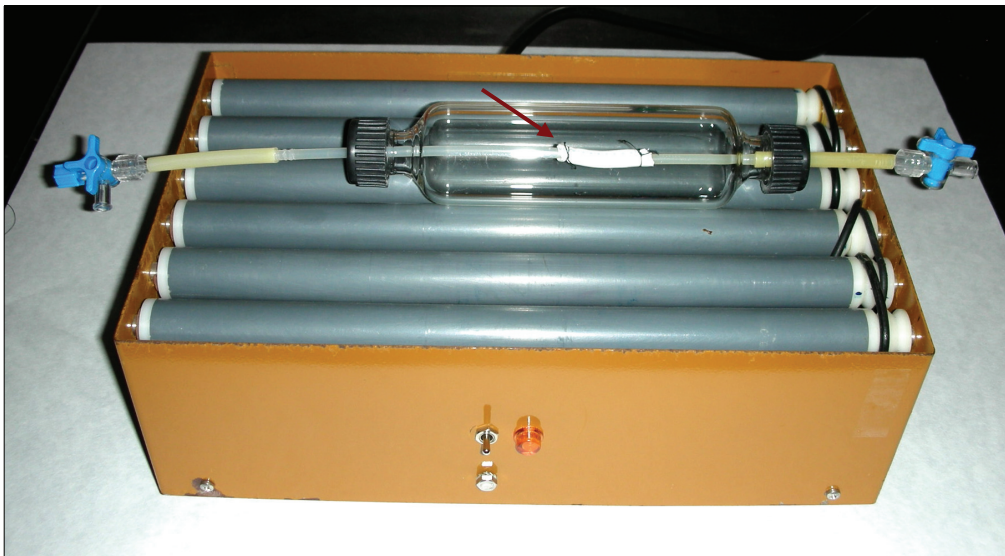


Figura 50: Dispositivo mecánico “roller” utilizado para la siembra de las prótesis de ePTFE. Se observa la cámara de siembra con el biomaterial en su interior (→).

Durante la incubación de la fibronectina, las células se tripsinizan, centrifugan y cuentan. El sedimento celular se resuspende a continuación en 1 mL de medio de cultivo. Se toma un volumen de la suspensión celular que contenga aproximadamente 2×10^5 células, y se completa con medio de cultivo fresco, hasta alcanzar un volumen total de 2 mL.

Para sembrar las células en el interior del biomaterial es necesario retirar el exceso de fibronectina una vez finalizado el periodo de incubación. Para ello, se coloca la cámara de siembra en posición vertical y se abren ambas llaves de tres vías, permitiendo que la fibronectina decante por acción de la gravedad, y volviendo a colocar la cámara de siembra en posición horizontal una vez la prótesis está libre de fibronectina. A continuación, se recoge la suspensión celular con una jeringuilla Plastipak™ de 2 mL, la cual se acopla a una de las llaves de tres vías y se inyectan las células a través de la cánula hasta rellenar por completo la luz del biomaterial.

Terminada esta operación, se cierran ambas llaves y se incuba la cámara de siembra durante 30 min en el interior del incubador de cultivos. Esta primera incubación se realiza en condiciones estáticas para facilitar que las células comiencen a anclarse a la superficie del biomaterial. Pasado este tiempo se retiran las células que no se hayan anclado a la prótesis, para lo que se inclina ligeramente la cámara de siembra y se abren las llaves de tres vías, permitiendo que la suspensión celular sobrante decante por efecto de la gravedad. Este paso es importante para evitar que las células en suspensión desanclen a aquéllas que han conseguido adherirse a la luz del biomaterial.

Una vez terminado este proceso, se gira la cámara de siembra 90° y se repite el proceso (inyección de la suspensión celular hacia el lumen protésico, posterior incubación en condiciones estáticas durante 30 min en el incubador de cultivos y retirada de la suspensión celular sobrante). Esta operación se realiza cuatro veces en total, permitiendo así una siembra celular en cuatro regiones diferentes del biomaterial que abarcan los 360° del lumen protésico.

Tras la cuarta siembra, la cámara de siembra se coloca sobre el “roller” y se incuba en condiciones dinámicas (giro continuo de 6 rph) manteniendo la cámara de siembra en el incubador de cultivos durante 16-24 h, tiempo durante el cual las células formarán una monocapa sobre la superficie luminal del biomaterial.

4.2.1.4 Circuito de flujo pulsátil

Una vez que las células han formado la monocapa en el lumen del biomaterial, los constructos se interponen en un circuito de flujo pulsátil dotado de una bomba peristáltica MasterFlex® Easy-Load® L/S® 7518-00 (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA) que bombea el medio de cultivo oxigenado a una velocidad de flujo aproximada de 100 mL/min.

Tras ser bombeado, el medio de cultivo viaja por unos tubos de goma flexible de 5 mm de diámetro interno (Cole-Palmer) y se direcciona en dos recorridos a su paso por un racor tricónico con forma de Y (Nordson Corporation): la mitad del medio de cultivo viaja hacia el lumen protésico, dando lugar a un flujo interno, y el resto origina un flujo externo que bañará la prótesis, manteniéndola hidratada en todo momento. Cuando el medio de cultivo de los flujos interno y externo abandona la cámara de siembra, es recirculado y bombeado al circuito nuevamente [figura 51].

Los constructos se mantienen sometidos a flujo durante un periodo de 1 h; pasado este tiempo, se detiene el circuito y las muestras se sumergen en una solución de glutaraldehído al 3% para su posterior evaluación mediante microscopía electrónica de barrido.

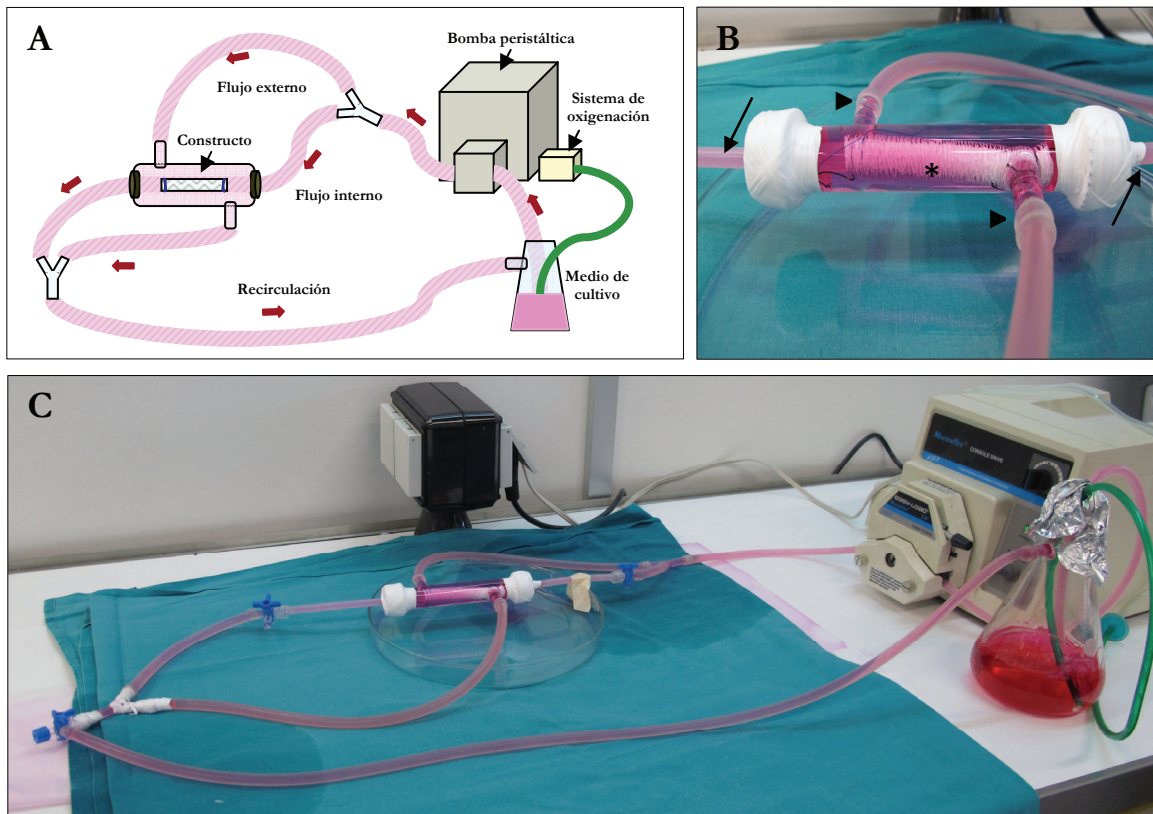


Figura 51: Interposición de los constructos vasculares en un circuito de flujo. **(A)** Esquema del diseño del circuito. **(B)** Detalle de la cámara de siembra con el biomaterial de ePTFE en su interior. Se puede observar claramente el equivalente tisular en el interior de la cámara de siembra (*), así como el recorrido del flujo interno (→) y del flujo externo (▶). **(C)** Imagen macroscópica del circuito de flujo en funcionamiento.

4.2.2 Validación de los equivalentes tisulares en un modelo animal

4.2.2.1 Animal de experimentación

El modelo animal diseñado para desarrollar este trabajo ha sido aprobado por el Comité Ético en Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Central de la Defensa “Gómez Ulla” (Madrid). El animal de experimentación seleccionado para llevar a cabo estos estudios es el perro de raza Beagle.

Se emplean un total de 8 perros adultos, con edades comprendidas entre 6 y 8 años, y un peso medio de 13-16 kg al comienzo del estudio. Los animales se mantienen estabulados durante todo el periodo de estudio en el estabulario del Centro de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Central de la Defensa “Gómez Ulla”, siguiendo la normativa nacional e internacional vigente (Real Decreto 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos).

4.2.2.2 Establecimiento de los grupos experimentales

El modelo animal que desarrollamos en este capítulo tiene como objetivo principal la validación de las estirpe WJC y la población celular diferenciada Dif-WJC como alternativa al uso de células endoteliales en el diseño de un constructo vascular.

Para ello, utilizamos constructos vasculares como los empleados en los circuitos de flujo previamente descritos. Además, añadimos un grupo experimental con siembra de células endoteliales, así como un grupo control en el cual el biomaterial carece de cubierta celular. Por tanto, los grupos de estudio son los siguientes:

1. Grupo experimental I: ePTFE control
2. Grupo experimental II: ePTFE + HUVEC
3. Grupo experimental III: ePTFE + WJC
4. Grupo experimental IV: ePTFE + Dif-WJC

Los biomateriales seleccionados para el desarrollo de este modelo *in vivo* pertenecen al grupo de las prótesis vasculares de pequeño calibre. Dentro de este grupo, hemos escogido biomateriales de ePTFE con 30 μm de porosidad y 4 mm de diámetro interno.

Implantamos segmentos de 4 cm de longitud de cada uno de estos constructos en la arteria femoral común (izquierda o derecha) de los animales de experimentación. Para ello, utilizamos un total de 8 animales: los primeros recibirán los constructos del grupo control -sin células- y los sembrados con HUVEC (n=4). A los animales restantes se les implantarán los constructos sembrados con WJC y Dif-WJC (n=4), tal y como se describe en la siguiente figura y tabla [figura 52 y tabla 10]:

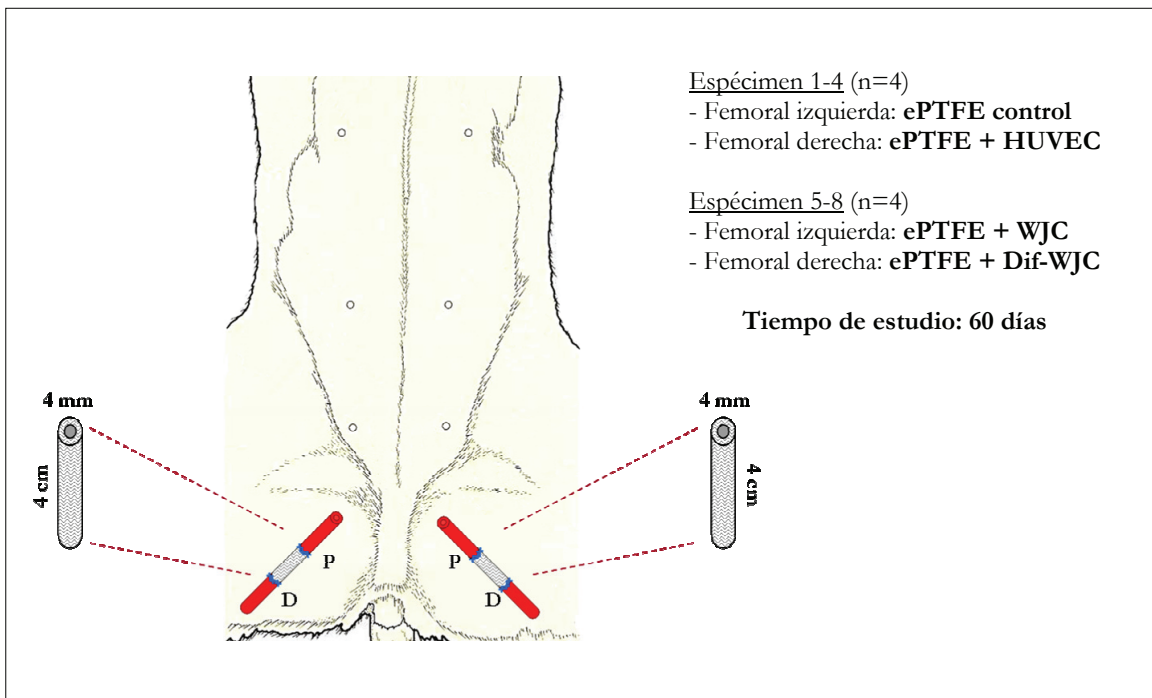


Figura 52: Esquema del diseño experimental. D = Anastomosis distal; P = Anastomosis proximal.

Grupo experimental	Equivalente tisular	Longitud	Diámetro interno	Localización anatómica del implante	Tamaño muestral
I	ePTFE control	4 cm	4 mm	Arteria femoral izquierda	n=4
II	ePTFE + HUVEC	4 cm	4 mm	Atería femoral derecha	n=4
III	ePTFE + WJC	4 cm	4 mm	Arteria femoral izquierda	n=4
IV	ePTFE + Dif-WJC	4 cm	4 mm	Atería femoral derecha	n=4

Tabla 10: Relación de los diferentes grupos experimentales y sus implantes.

4.2.2.3 Protocolo preoperatorio y técnica anestésica

Todos los animales se someten a dieta absoluta desde el día previo a la intervención quirúrgica. Se suministra una profilaxis antibiótica con Amoxicilina (11 mg/kg cada 12 h), que se mantiene durante los 8 días posteriores a la operación. Se administra Meloxicam (0,2 mg/kg/día) como analgésico durante un periodo de 4 días desde la intervención.

La técnica anestésica se lleva a cabo mediante la inyección intramuscular de un cóctel que contiene los siguientes fármacos: Medetomidina (0,03 mL/kg), Butorfanol (0,02 mL/kg) y Atropina (0,04 mL/kg). Los animales se mantienen intubados de forma orotraqueal y se les suministra Sevoflurano (a concentración del 4%) por vía inhalatoria para mantener el efecto anestésico durante la intervención.

4.2.2.4 Procedimiento quirúrgico

Los animales se intervienen anestesiados, monitorizados, en posición decúbito supino [figura 53], y se les suministra por vía sistémica heparina (100 U/kg) como anticoagulante.

En un único acto quirúrgico, se procede a realizar el implante de los constructos vasculares, comenzando por la arteria femoral izquierda, y a continuación por la derecha.

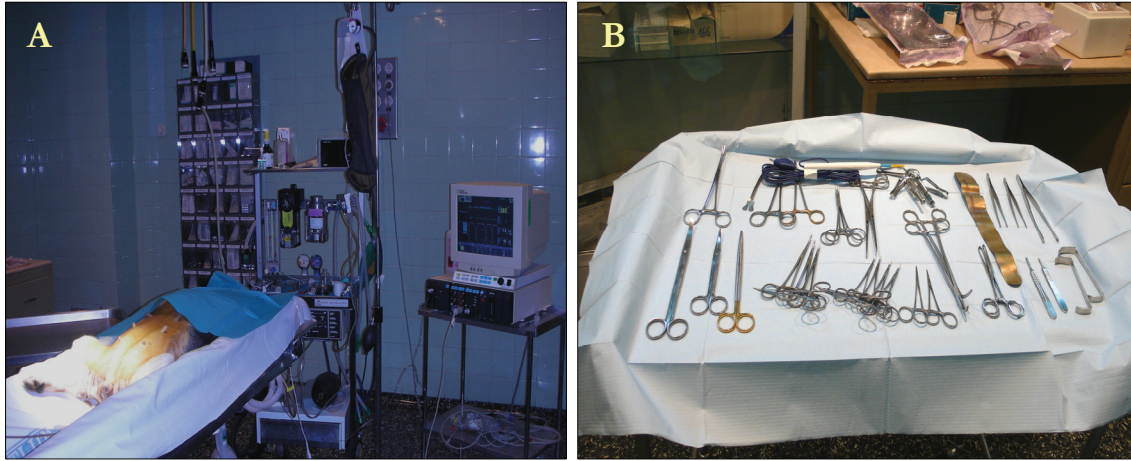


Figura 53: Preparación del campo quirúrgico al inicio de la intervención. **(A)** El animal permanece anestesiado y monitorizado en todo momento. **(B)** Campo estéril con el instrumental quirúrgico necesario.

En primer lugar, se realiza una incisión en el triángulo de Scarpa, se disecciona el trígono femoral y se controlan las arterias femorales superficial, profunda y común mediante el uso de bandas de silicona. A continuación se clampa la arteria femoral común en dos puntos distantes 5 cm entre sí, utilizando clamps vasculares; se secciona la arteria y se interpone un segmento del equivalente tisular de 4 cm de longitud. Se utiliza una sutura no reabsorbible Prolene* de 7/0 (Ethicon Ltd) para realizar la anastomosis término-terminal [figura 54].

Finalmente, se procede a cerrar por planos, utilizando una sutura absorbible Vicryl* 2/0 (Ethicon Ltd) para suturar el tejido celular subcutáneo, y grapas Manipler® AZ (B Braun Melsungen AG, Germany) para cerrar la piel.

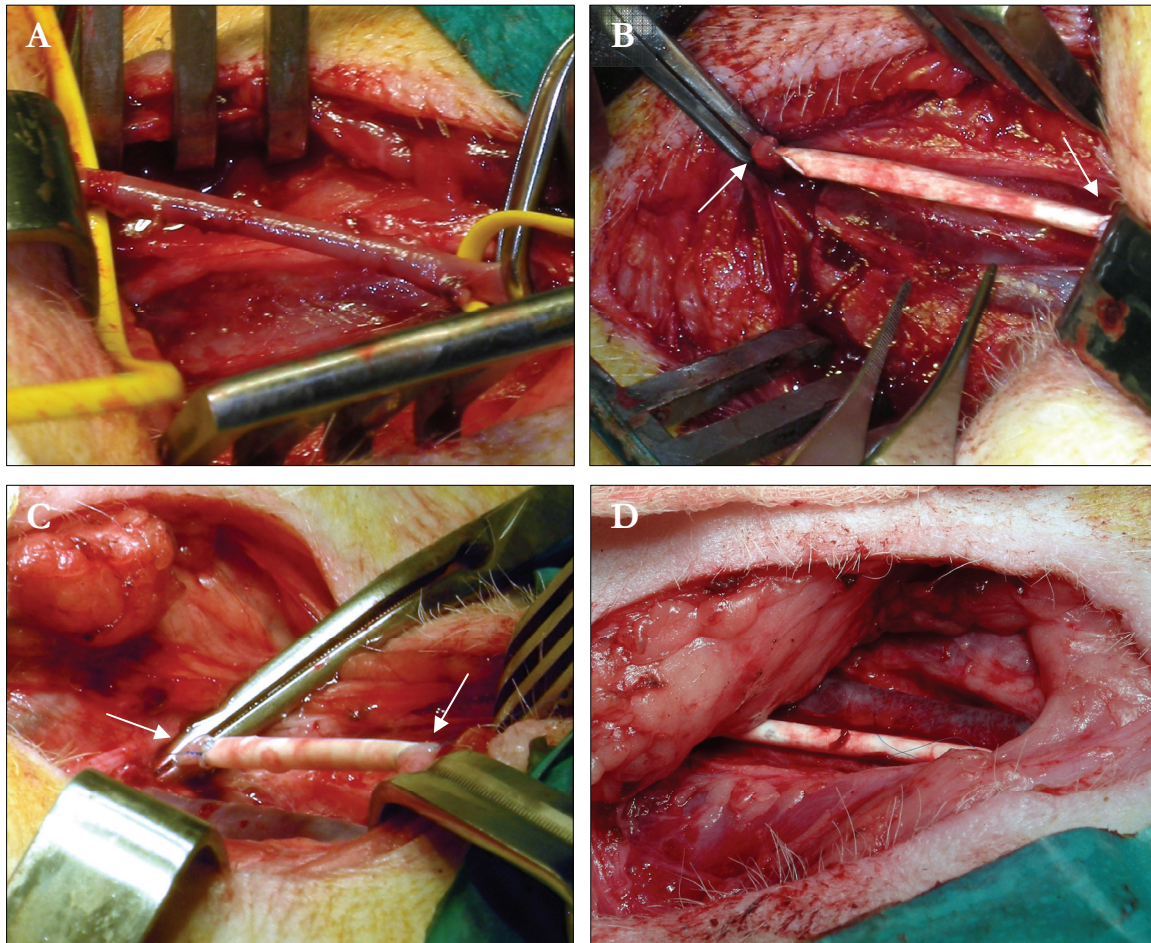


Figura 54: Procedimiento quirúrgico en arteria femoral común. **(A)** Tras localizar la arteria femoral común, ésta se localiza y controla con bandas de silicona. **(B)** Tras clampar la arteria en dos puntos distantes 5 cm entre sí, se secciona y se procede a suturar el injerto en los extremos proximal y distal (→). **(C)** Una vez finalizada la anastomosis en ambos extremos, se retiran los clamps, restableciendo el flujo sanguíneo en el vaso (→). **(D)** Aspecto del injerto una vez finalizada la intervención.

Al finalizar el tiempo de estudio establecido de 60 días, los animales son nuevamente anestesiados y se procede a extraer los injertos. Se realiza una incisión próxima a la herida cicatrizada, y posteriormente se localiza y controla la arteria femoral, se clampa y se secciona en dos puntos distantes 2-3 cm de las zonas de anastomosis proximal y distal. De este modo, la muestra recolectada no sólo contiene el injerto sino también la zona anastomótica y parte del tejido receptor. El animal es a continuación sacrificado mediante sobredosis anestésica.

Una vez extraídas las muestras, se lavan cuidadosamente y se dividen en regiones proximal, central y distal para su posterior procesamiento histológico, siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior. La mitad de las secciones de cada muestra recogida se sumergen en la solución fijadora F13, y se mantienen en fijación durante una semana a 4 °C para su posterior análisis histológico. El resto, se introduce en una solución de glutaraldehído al 3% para su evaluación a microscopía electrónica de barrido.

4.2.3 Estudios histológicos

Una vez fijadas, las muestras de tejido se procesan para su análisis histológico siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior (apartado 3.2.10 “estudios histológicos”).

4.2.4 Estudios inmunohistoquímicos

Se llevan a cabo una serie de análisis inmunohistoquímicos para evaluar la reacción macrofágica provocada en respuesta a la colocación del injerto. Los anticuerpos, así como las diluciones empleadas en cada caso se detallan en las tablas 11 y 12 [tablas 11 y 12].

Para poder llevar a cabo las técnicas inmunohistoquímicas, los cortes histológicos se desparafinan por inmersión en xilol (30 min), se rehidratan realizando incubaciones de 5 min en alcoholes de gradación descendente (100°, 96°, 70°) y se hidratan completamente con agua destilada. Para detectar la reacción antígeno-anticuerpo se utiliza el método de la avidina-biotina, usando como trazador la fosfatasa alcalina.

Las muestras, una vez hidratadas, se lavan con PBS 1X a pH= 7,4 y se incuban con Tritón X-100 al 0,1% (diluido en PBS) durante 15 min a temperatura ambiente para permeabilizar las membranas celulares. A continuación se lavan nuevamente con PBS

1X y se bloquean las zonas de unión inespecífica mediante la incubación con BSA al 4% (diluida en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se añade el anticuerpo primario correspondiente diluido en BSA al 4% a la concentración adecuada [tabla 10], y las muestras se incuban durante toda la noche a 4 °C. A las muestras que corresponden al control negativo no se les añade anticuerpo primario, y se incuban sumergidas en BSA al 4%.

Al día siguiente, tras atemperar las muestras, se procede al lavado con PBS para eliminar los restos de anticuerpo. A continuación se añade el anticuerpo secundario biotinado correspondiente en cada caso diluido en PBS a la concentración adecuada [tabla 11], y se incuban durante 90 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo las muestras se lavan con PBS y se incuban con el complejo Estreptavidina[®]-Fosfatasa alcalina diluido en PBS a concentración 1:200 durante 60 min a temperatura ambiente.

Tras un nuevo lavado con PBS, se procede al revelado utilizando un sustrato cromogénico compuesto por: 10 mL PBS 1X, 10 mg α -naftol AS-BI fosfato, 10 mg Fast Red, y 100 μ l Levamisole 0.1 M (los tres de Sigma-Aldrich). La incubación con este sustrato (15 min, controlando la aparición de marcaje bajo el microscopio) nos permite obtener un marcaje de color rojo intenso. Una vez revelado, se sumergen las muestras en agua destilada para detener la reacción cromogénica, y los núcleos celulares se contrastan mediante tinción con hematoxilina de Carazzi durante 15 min. Finalmente, las muestras se lavan con agua corriente y se montan en medio acuoso con Plasdon. La visualización del marcaje se realiza con un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Carl Zeiss).

Anticuerpos primarios utilizados en el estudio de los injertos vasculares				
Anticuerpo	Clon	Especificidad	Dilución	Proveedor
Macrófagos	MAC387 Monoclonal	Reconoce una molécula expresada en granulocitos, monolitos y macrófagos.	1:500	Abcam (ab22506)

Tabla 11: Anticuerpo primario empleado en los estudios inmunohistoquímicos.

Anticuerpo secundario conjugado				
Anticuerpo	Clon	Molécula conjugada	Dilución	Proveedor
Goat anti-mouse IgG	---- Policlonal	Biotina	1:300	Sigma (B0529)

Tabla 12: Anticuerpo secundario empleado en los estudios inmunohistoquímicos.

4.2.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras recolectadas para su evaluación por microscopía electrónica de barrido se sumergen en la solución fijadora glutaraldehído 3% durante 2 h y posteriormente se lavan con tampón Milloning durante 5 min. El procesamiento de las muestras se lleva a cabo mediante deshidratación con alcoholes de gradación creciente (30°, 50°, 70°, 90° y 100°), con tiempos de inmersión de 15 min para los tres primeros alcoholes y de 20 min para los dos de mayor gradación. A continuación, las piezas se montan en estuches de papel Filter-Lab® (Filtros Anovia S.A., Barcelona, Spain) y se someten a punto crítico en un equipo Polaron CPD7501 (Fisons Instruments, Ipswich, UK.), a fin de deshidratarlas completamente. Finalizado este proceso, las muestras se montan en platinas de aluminio de 1,3 cm de diámetro (TAAB Laboratorios Equipment Ltd, Berks, UK), se metalizan con una aleación de oro-paladio en un metalizador Polaron SEM Coating System (Quorum Technologies Ltd, Lewes, UK) y se visualizan utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950 (Carl Zeiss) con un voltaje de 20kv.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Evaluación de las siembras celulares

La experiencia previa de nuestro Grupo en el campo de la siembra celular sobre biomateriales de ePTFE pretratados con fibronectina nos permite saber que, 24 h después de la siembra, las células endoteliales se encuentran adheridas a la superficie protésica formando una capa celular monoestratificada y homogénea que recubre toda la superficie del biomaterial. La capa es tan uniforme que apenas se distinguen las uniones celulares, y se mantiene estable a las 48 h. Pasados 7 días, se aprecia una gran denudación celular, que deja al descubierto la mayoría de la superficie del ePTFE. Las células que se mantienen adheridas al sustrato presentan un cambio morfológico notable, ya que modifican su fenotipo poligonal característico por uno más elongado (Bellón y cols., 1992; Buján 1992a; Bellón y cols., 1994b).

En el caso del ePTFE sembrado con WJC, observamos que tras 24 h las células recubren más del 90% de la superficie protésica. Las WJC se presentan estiradas y comunican entre sí formando una capa homogénea a lo largo de todo el biomaterial [figura 55]. A las 48 h comprobamos que algunas regiones del biomaterial están denudadas, aunque el porcentaje de recubrimiento sigue siendo muy elevado. En estas regiones, la capa celular está formada por varios estratos celulares y se ha vuelto muy compacta, ya que las WJC se presentan estrechamente unidas entre sí [figura 55]. Tras 7 días, observamos una mayor denudación celular sobre la superficie protésica, y la capa celular que aún se conserva está muy compactada, aunque en algunas zonas es posible detectar células individualizadas así como abundantes restos celulares [figura 55].

En las prótesis sembradas con Dif-WJC, observamos que tras 24 h las células han recubierto prácticamente toda la superficie del biomaterial. Sin embargo, el número de células adheridas al ePTFE parece menor que en el caso de la siembra con células indiferenciadas, y de la misma forma se puede observar una mayor cantidad de restos

celulares en este punto [figura 56]. A las 48 h post-siembra, el aspecto que presenta el biomaterial no varía con respecto al observado el día anterior, y comprobamos que en este punto las Dif-WJC no son capaces de formar una capa celular compacta como la observada en la siembra con WJC [figura 56]. Tras 7 días, observamos una gran denudación celular, y en algunas regiones del biomaterial comprobamos la presencia de una capa celular de consistencia irregular, acompañada de una gran cantidad de restos celulares [figura 56].

A la hora de evaluar la efectividad de los constructos vasculares en condiciones dinámicas, la experiencia de nuestro Grupo indica que las prótesis tubulares de ePTFE sembradas con células endoteliales sufren una denudación celular superior al 80% tras estar expuestas a flujo durante un periodo de 1 h (García-Honduvilla y cols., 2008). Estos resultados son similares a los obtenidos con nuestros constructos de ePTFE sembrados con WJC y Dif-WJC y sometidos a flujo pulsátil.

Tras analizar el comportamiento de estos constructos vasculares, comprobamos que el ePTFE con siembra de WJC presenta una importante denudación celular tras ser sometido a flujo pulsátil durante 1 h, con porcentajes superiores al 70%. En las regiones no denudadas, las WJC se encuentran estiradas, adheridas al lumen del biomaterial, y la mayoría de ellas mantienen el contacto con las células vecinas, formando una monocapa frágil muy delgada [figura 57].

El porcentaje de denudación celular observado en la superficie luminal de los constructos de ePTFE + Dif-WJC es muy elevado, alcanzando valores que superan el 80% de pérdida celular. Las Dif-WJC de estos constructos están poco estiradas y la mayoría de ellas se encuentran aisladas, facilitando así su desprendimiento del lumen protésico, ya que no forman una monocapa resistente a la fuerza ejercida por el flujo [figura 58].

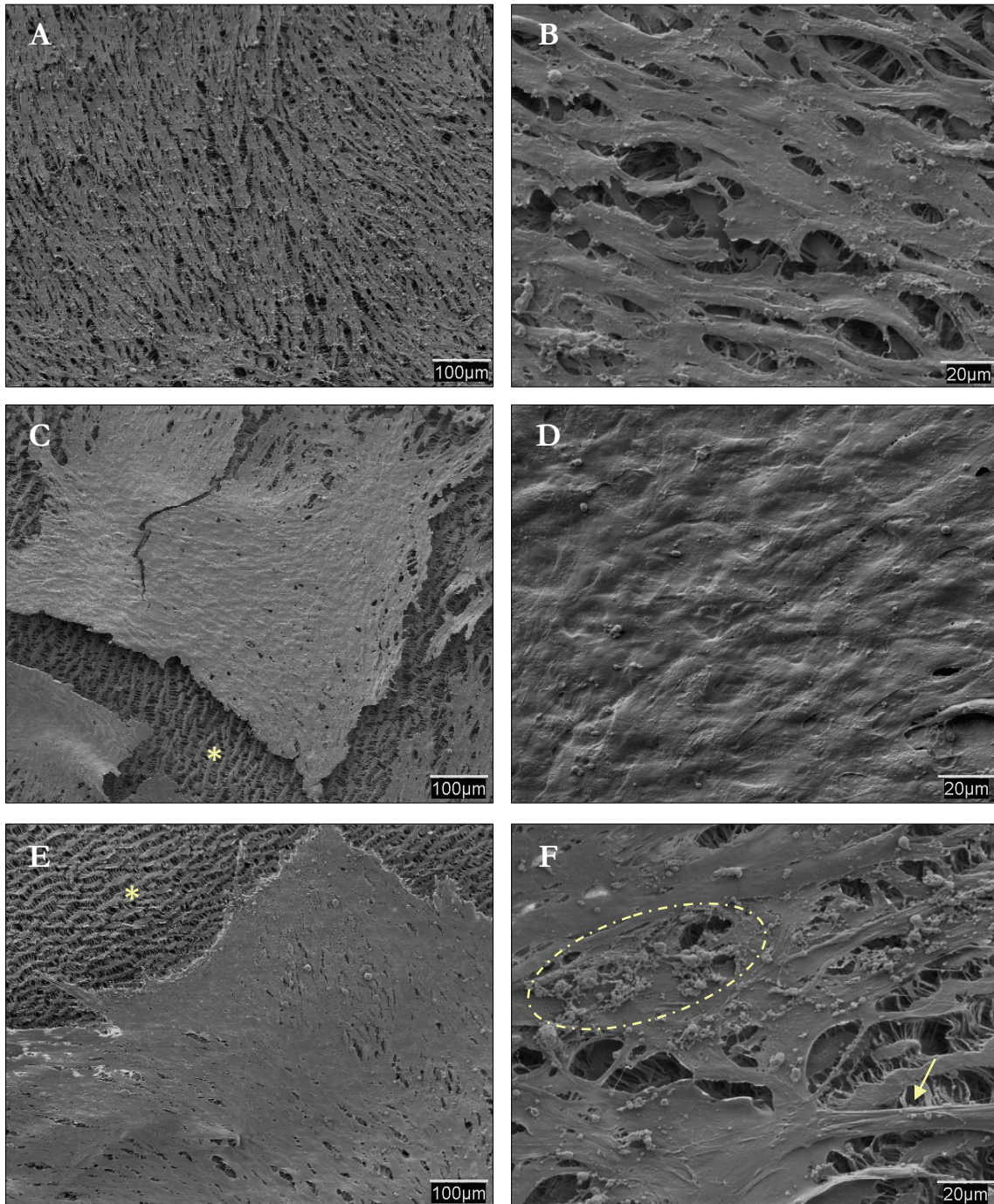


Figura 55: Siembra en plano de WJC sobre fragmentos de ePTFE. **(A, B)** Tras 24 h post-siembra, las células forman una capa que recubre prácticamente toda la superficie del biomaterial (MEB, a 100 y 500 aumentos, respectivamente). **(C, D)** Esta capa celular se aprecia muy compacta a las 48 h, y comienza a haber cierta denudación celular, dejando la superficie del ePTFE (*) al descubierto (MEB, a 100 y 500 aumentos, respectivamente). **(E, F)** Tras 7 días se observa una denudación elevada (*), la capa celular está menos compacta (→), y hay abundantes restos celulares (----) (MEB, a 100 y 500 aumentos, respectivamente).

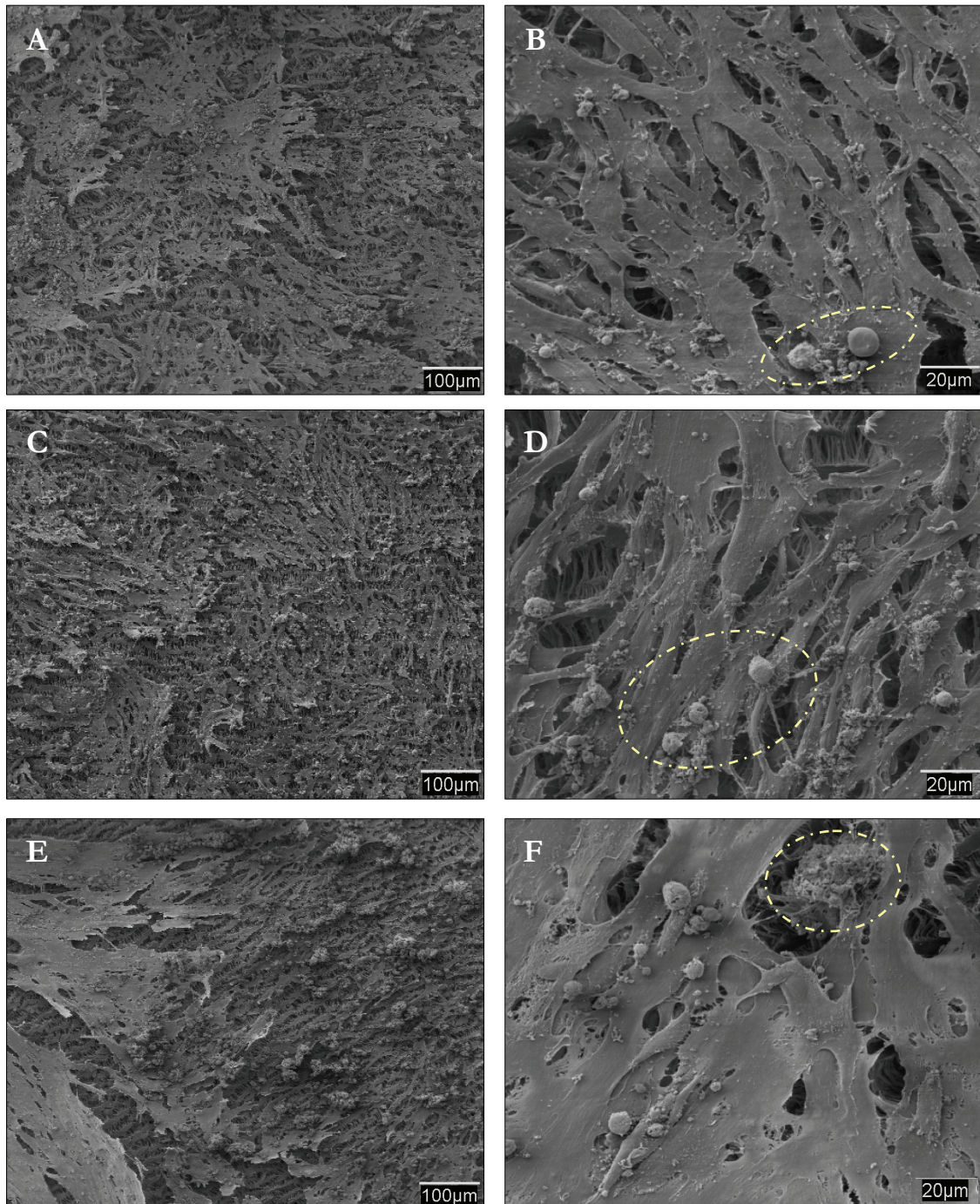


Figura 56: Siembra en plano de Dif-WJC sobre fragmentos de ePTFE. **(A, B)** A las 24 h post-siembra, las células recubren prácticamente toda la superficie del biomaterial, acompañadas de restos celulares (----) (MEB, a 100 y 500 aumentos, respectivamente). **(C, D)** Tras 48 h el aspecto de la siembra es muy similar, a excepción de los restos celulares, que aumentan ligeramente (----) (MEB, a 100 y 500 aumentos, respectivamente). **(E, F)** Pasados 7 días se observan pequeñas capas celulares poco compactas e irregulares, acompañadas de grandes zonas denudadas (*) así como de restos celulares (----) (MEB, a 100 y 500 aumentos, respectivamente).

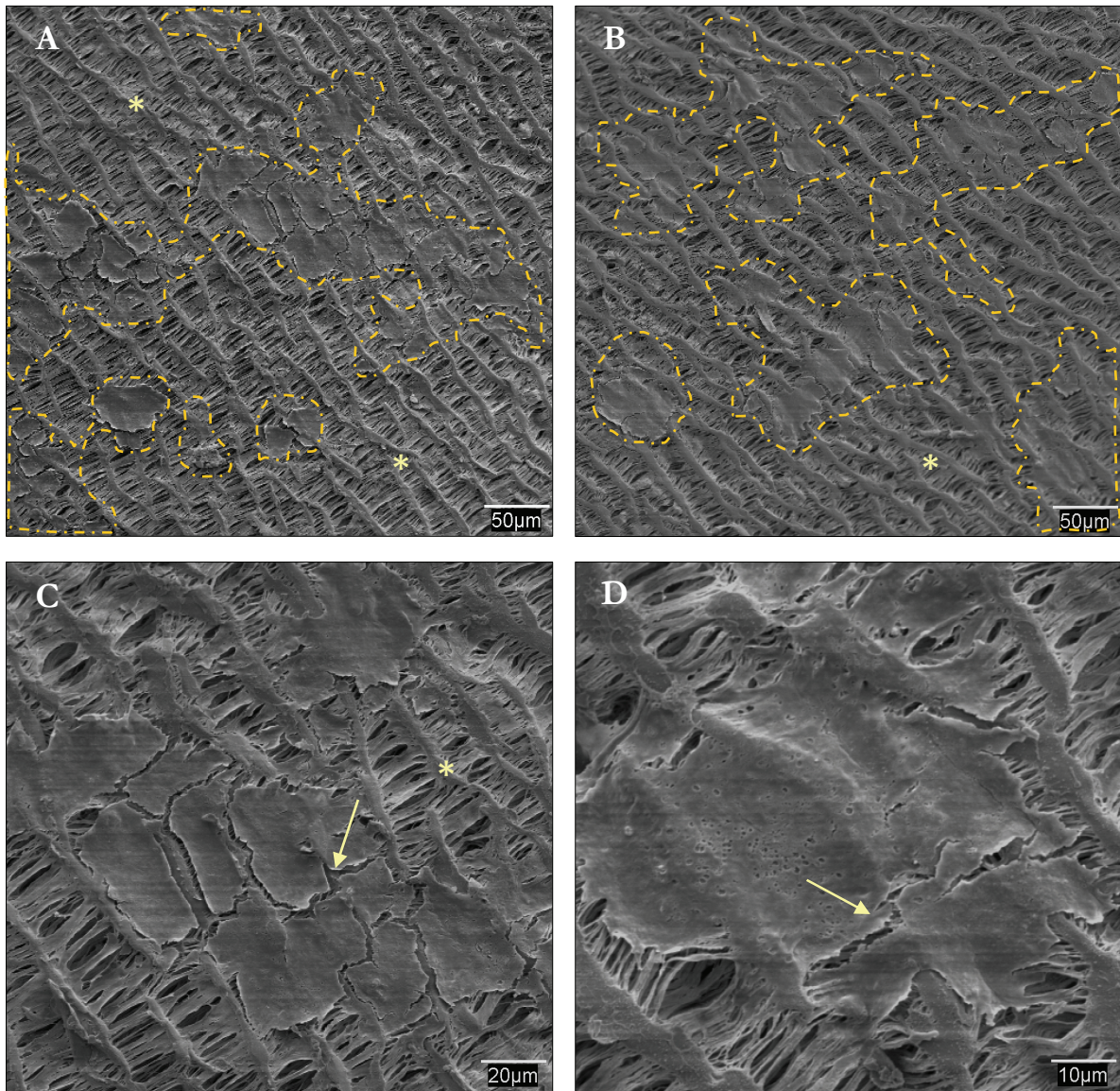


Figura 57: Constructos tubulares de ePTFE + WJC, tras ser sometidos a flujo pulsátil en un circuito *in vitro* durante 1 h. **(A, B)** La superficie luminal del biomaterial presenta una elevada denudación celular (*). Las células que se han mantenido adheridas al ePTFE se encuentran estiradas y comunican entre sí, formando una monocapa (----) (MEB, 200 aumentos). **(C)** Monocapa celular sobre el ePTFE. Se pueden apreciar las uniones entre células vecinas (→) y las zonas denudadas (*) (MEB, 500 aumentos). **(D)** Detalle de una unión celular (→) (MEB, 1.000 aumentos).

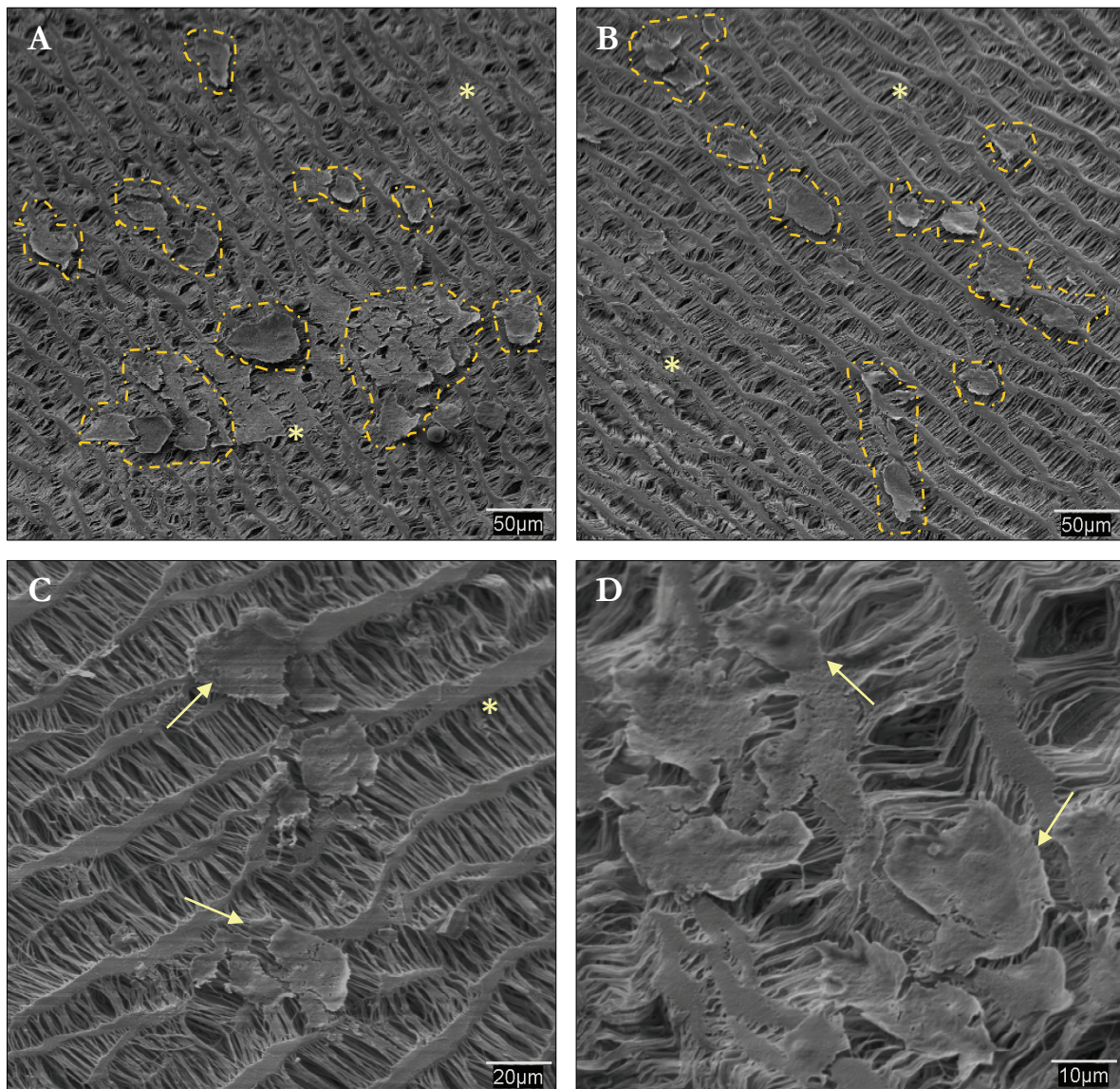


Figura 58: Constructos tubulares de ePTFE + Dif-WJC, tras ser sometidos a flujo pulsátil en un circuito *in vitro* durante 1 h. **(A, B)** La denudación observada en estos constructos es muy elevada, alcanzando valores del 80% de la superficie luminal denudada (*). Las células adheridas al biomaterial están poco estiradas y en general aisladas (----) (MEB, 200 aumentos). **(C)** Aspecto de las Dif-WJC adheridas al ePTFE (→). Se puede observar la gran denudación celular presente en este tipo de constructos (*) (MEB, 500 aumentos). **(D)** La superficie que abarcan estas células en el ePTFE es menor que la observada en WJC (→) (MEB, 1.000 aumentos).

Una vez analizada la superficie de los constructos en condiciones estáticas y dinámicas, llevamos a cabo una comparación cuantitativa del porcentaje de denudación celular observado en cada caso. Así, podemos comprobar que, bajo condiciones estáticas, la denudación celular presente en todos los constructos aumenta progresivamente con el tiempo. Los tres tipos de constructos tienen un comportamiento semejante entre sí en cada tiempo de estudio, a excepción de los sembrados con WJC, cuya denudación celular es más significativamente más acusada a las 48 h post-siembra en comparación con HUVEC (* $p < 0,05$), y Dif-WJC (** $p < 0,01$). Además, los constructos sembrados con HUVEC son ligeramente menos estables a largo plazo que los sembrados con WJC y Dif-WJC, presentando un porcentaje de denudación sensiblemente mayor tras 7 días de estudio (* $p < 0,05$) [figura 59].

Independientemente del grupo de estudio, todos los constructos evaluados bajo condiciones estáticas presentan un significativo incremento en la denudación celular entre el inicio -24, 48 h- y el final del estudio -7 días- (** $p < 0,01$) [figura 59].

Finalmente, bajo condiciones dinámicas, comprobamos que todos los constructos tienen una elevada denudación celular tras ser sometidos a flujo durante 1 h. Las prótesis sembradas con WJC son las que presentan mejor comportamiento, al tener un porcentaje de denudación ligeramente inferior al observado en los constructos sembrados con HUVEC (* $p < 0,05$) y Dif-WJC [figura 59].

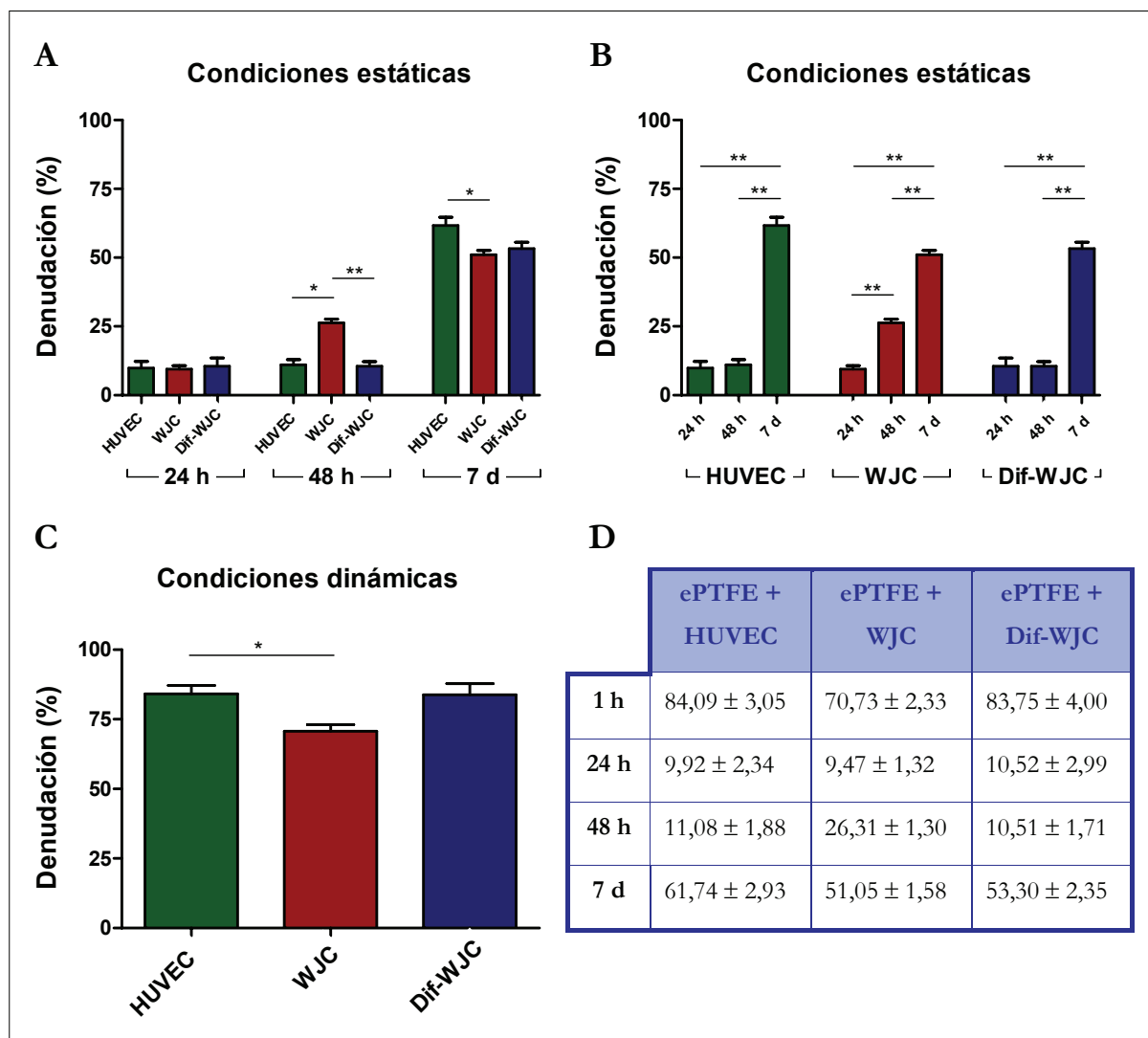


Figura 59: Porcentaje de denudación en los diferentes constructos de ePTFE sembrados con HUVEC, WJC y Dif-WJC. **(A, B)** Bajo condiciones estáticas, la denudación aumenta notablemente a partir de las 48 h post-siembra en todos los grupos experimentales. **(C)** Cuando los constructos se someten a flujo pulsátil, sufren una elevada denudación tras 1 h, siendo los sembrados con WJC los que presentan un mejor comportamiento. **(D)** Tabla resumen con los valores de la media ± desviación típica correspondientes al porcentaje de denudación medido en cada grupo de estudio.

4.3.2 Evaluación de los implantes vasculares

Una vez valorado el comportamiento de los constructos vasculares bajo condiciones experimentales *in vitro*, estos son implantados en un modelo canino de sustitución arterial.

De los 8 animales intervenidos, 7 finalizaron el tiempo de estudio establecido, y uno de ellos falleció tras un periodo a los 30 días de la intervención, por lo que el índice de mortalidad obtenido es del 12,5%.

Tras recolectar los injertos, comprobamos que los constructos formados por el biomaterial de ePTFE + HUVEC presentan un porcentaje de trombosis del 25%, siendo este grupo experimental el de mayor permeabilidad. Este resultado contrasta con los demás grupos experimentales, ya que los sembrados con WJC y Dif-WJC tienen un índice de trombosis del 55 y 50% respectivamente, y el grupo control del 75%.

La mayoría de los injertos presentan un lumen protésico permeable, levemente o parcialmente ocluido, permitiendo el paso de la sangre a través de la prótesis. Tan sólo en un caso del grupo experimental ePTFE + WJC, el lumen del injerto está totalmente ocluido [tabla 13].

Espécimen	Grupo experimental	Localización anatómica del implante	Estado del injerto tras 60 días
1	ePTFE control	Arteria femoral izquierda	Permeable
	ePTFE + HUVEC	Arteria femoral derecha	Parcialmente ocluido
2	ePTFE control	Arteria femoral izquierda	Levemente ocluido
	ePTFE + HUVEC	Arteria femoral derecha	Permeable
3	ePTFE control	Arteria femoral izquierda	Parcialmente ocluido
	ePTFE + HUVEC	Arteria femoral derecha	Permeable
4	ePTFE control	Arteria femoral izquierda	Parcialmente ocluido
	ePTFE + HUVEC	Arteria femoral derecha	Permeable
5	ePTFE + WJC	Arteria femoral izquierda	----
	ePTFE + Dif-WJC	Arteria femoral derecha	----
6	ePTFE + WJC	Arteria femoral izquierda	Levemente ocluido
	ePTFE + Dif-WJC	Arteria femoral derecha	Permeable
7	ePTFE + WJC	Arteria femoral izquierda	Permeable
	ePTFE + Dif-WJC	Arteria femoral derecha	Permeable
8	ePTFE + WJC	Arteria femoral izquierda	Totalmente ocluido
	ePTFE + Dif-WJC	Arteria femoral derecha	Levemente ocluido

Tabla 13: Estado de los injertos en cada espécimen al finalizar el tiempo de estudio. Nótese que el animal número 5 ha sido descartado al fallecer a los 30 días post-implante.

4.3.2.1 Grupo experimental I: ePTFE control

La ausencia de siembra celular en la superficie de los injertos del grupo control influye en la trombogenicidad de los mismos. El índice de trombosis observado en este grupo de estudio es muy elevado, ya que el 75% de los constructos evaluados presentan oclusión en mayor o menor grado. Macroscópicamente, Se puede apreciar que el injerto está rodeado de una capa adventicia que surge desde las zonas perianastomóticas y se expande hacia la región central [figura 60].

La capa neoadventicia, de gran espesor y con contenido de fibras de colágeno, tapiza toda la superficie externa del injerto. En su región más apical, esta capa se encuentra muy vascularizada. Observamos también la presencia de células de aspecto elongado que recorren longitudinalmente esta capa neoformada [figura 61].

En la superficie luminal de estos injertos podemos apreciar la formación de hiperplasia intimal. Observamos una capa neoíntima que tapiza gran parte de la superficie del ePTFE, con un espesor creciente a lo largo del eje proximal-distal. Esta capa neoíntima, parcialmente endotelizada, está formada por células miointimales inmersas en una matriz fibrilar [figura 62].

Bajo microscopía electrónica de barrido, la superficie luminal de estos injertos se presenta como una capa heterogénea en la que, a lo largo de todo el eje proximal-distal, se intercalan zonas en las que predominan acúmulos de material trombogénico (fibrina y hematíes) con otras en las que es posible observar una capa celular de superficie irregular [figura 63]. Estos injertos presentan una notable infiltración celular en la pared del biomaterial, especialmente en los tercios luminal y adventicial, aunque en algunas regiones también encontramos células infiltradas en el tercio medial de la prótesis [figura 64].

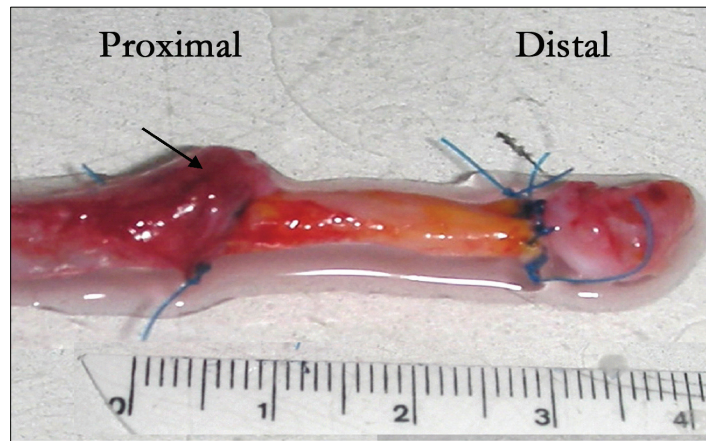


Figura 60: Imagen macroscópica de un injerto de ePTFE sin siembra celular. La capa neoadventicia formada (→) recubre el biomaterial desde las regiones perianastomóticas hacia la zona central del constructo.

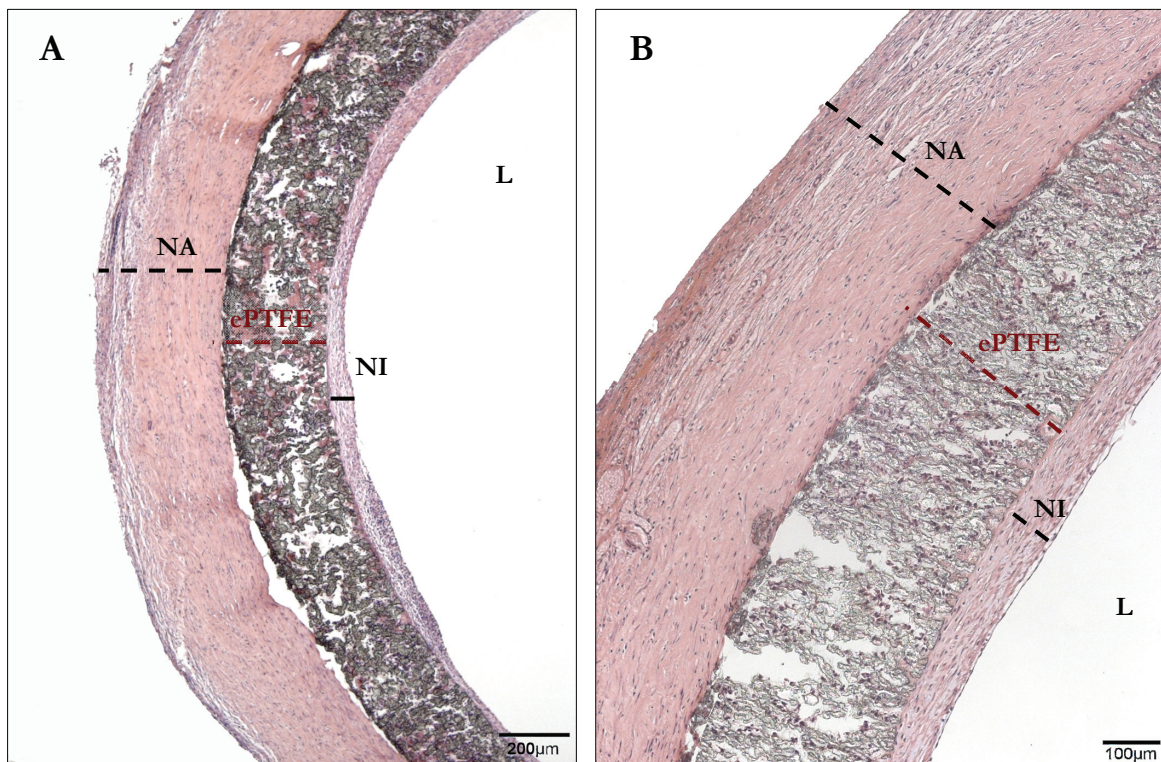


Figura 61: Histología de los constructos de ePTFE control. La capa neoadventicia es muy espesa y se distribuye a lo largo de todo el eje proximal-distal del injerto. **(A)** Región proximal (tinción HE, 50 aumentos). **(B)** Región distal (tinción HE, 100 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia; NI = Neointima.

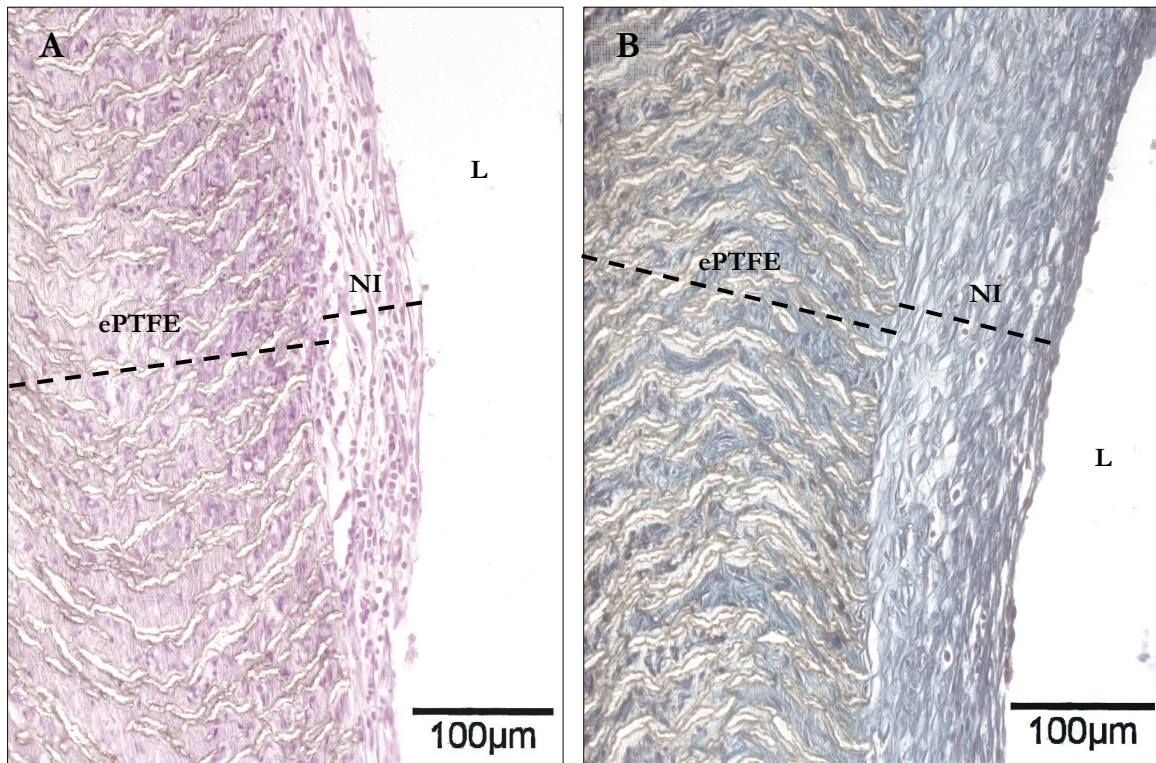


Figura 62: Histología de los constructos de ePTFE control. El espesor de la capa neoíntima formada en el lumen del injerto incrementa en sentido proximal-distal. **(A)** Región proximal (tinción HE, 100 aumentos). **(B)** Región distal (tinción TM, 100 aumentos). L = Lumen; NI = Neoíntima.

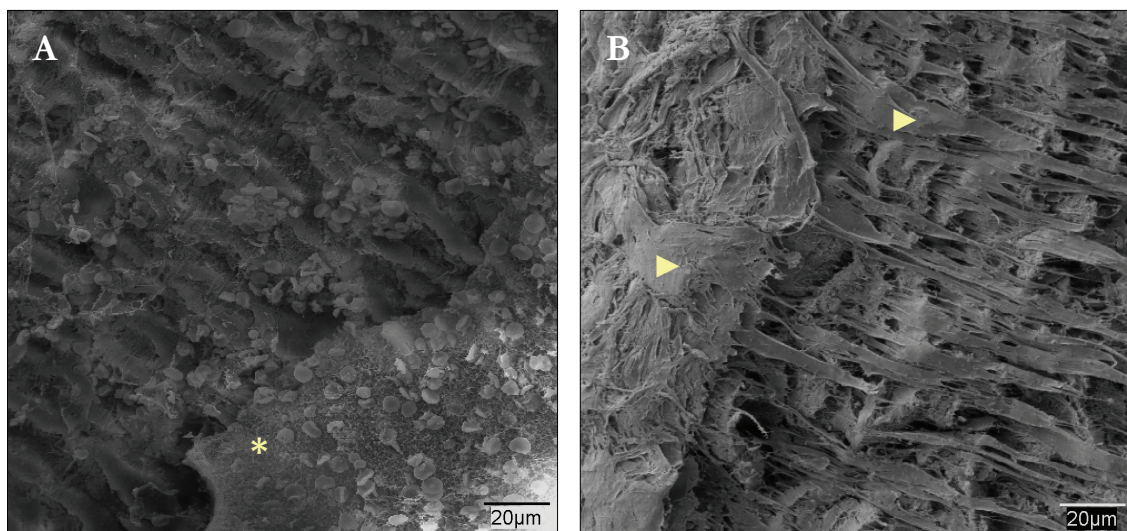


Figura 63: Lumen protésico de los constructos de ePTFE control. **(A)** A lo largo de todo el injerto se observan zonas en las que predominan acúmulos de material trombogénico (*). **(B)** En el resto del injerto se aprecia una capa de superficie irregular (▶) que tapiza la gran mayoría del lumen protésico (MEB, ambas a 500 aumentos).

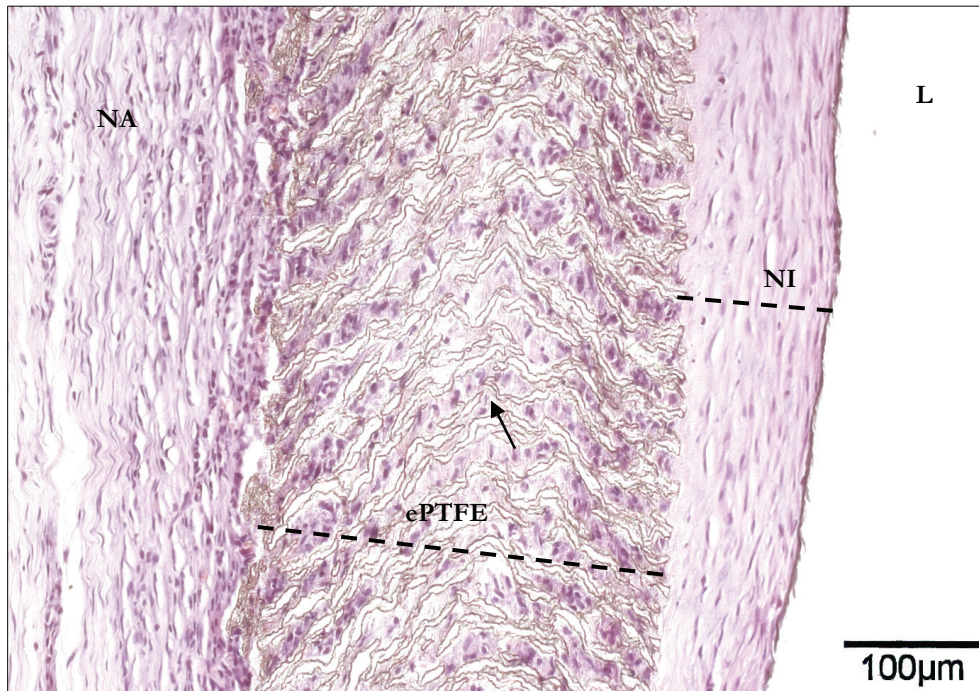


Figura 64: Infiltración celular en la pared de los constructos de ePTFE control. Las células se infiltran desde los tercios luminal y adventicial del biomaterial, llegando a colonizar el tercio central en algunos puntos del injerto (→) (tinción HE, 200 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia; NI = Neointima.

4.3.2.2 Grupo experimental II: ePTFE + HUVEC

De los diferentes constructos vasculares estudiados, los formados por ePTFE + HUVEC son los que presentan un mayor porcentaje de permeabilidad, ya que prácticamente todo el lumen del biomaterial está libre de oclusión, salvo en algunas regiones donde se observan acúmulos puntuales de material trombogénico [figura 65].

Histológicamente, estos constructos presentan una capa neoadventicia muy desarrollada, con fibras de colágeno que se distribuyen homogéneamente a lo largo de todo el eje proximal-distal. Al igual que en el caso anterior, esta capa contiene abundantes células de aspecto elongado, así como una marcada microvasculatura. La capa neointima que tapiza la superficie luminal del biomaterial se distribuye a lo largo de todo el injerto. Su espesor medio es notablemente menor que el observado en los

constructos del grupo control, y tiende a incrementar a medida que se aproxima a la anastomosis distal [figura 66]. Nuevamente, las células miointimales que componen esta capa, aparecen inmersas en una matriz fibrilar rica en colágeno.

Al analizar la superficie luminal de estos constructos a microscopía electrónica de barrido, observamos que la capa neoíntima se distribuye por prácticamente todo el lumen protésico, a excepción de algunas regiones desnudas, generalmente acompañadas de material trombogénico. [figura 67]. Esta neoíntima presenta en su superficie más luminal una monocapa aparentemente estable, formada por células de fenotipo poligonal característico de la población endotelial, y se extiende a lo largo de todo el eje proximal-distal del injerto [figura 68].

La pared del ePTFE de estos injertos presenta una discreta infiltración celular a lo largo de todo el biomaterial, especialmente en el tercio luminal [figura 69].

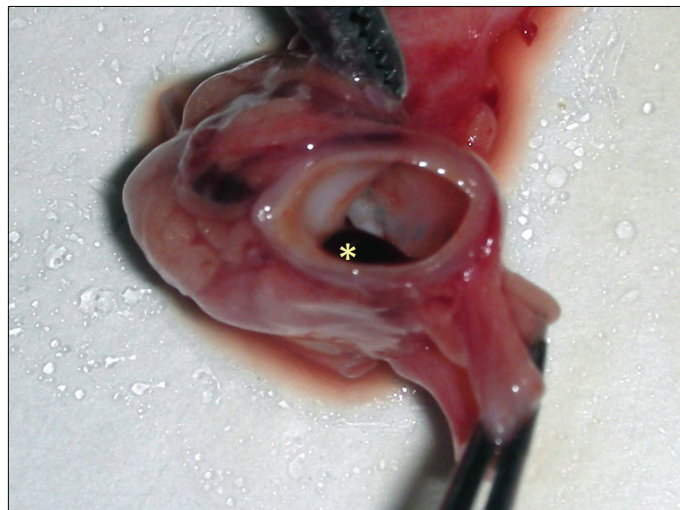


Figura 65: Imagen macroscópica del lumen de un injerto de ePTFE + HUVEC en su región proximal, tras ser extirpado. Se observa que el constructo está permeable, salvo en una región localizada donde hay presencia de material trombogénico (*).

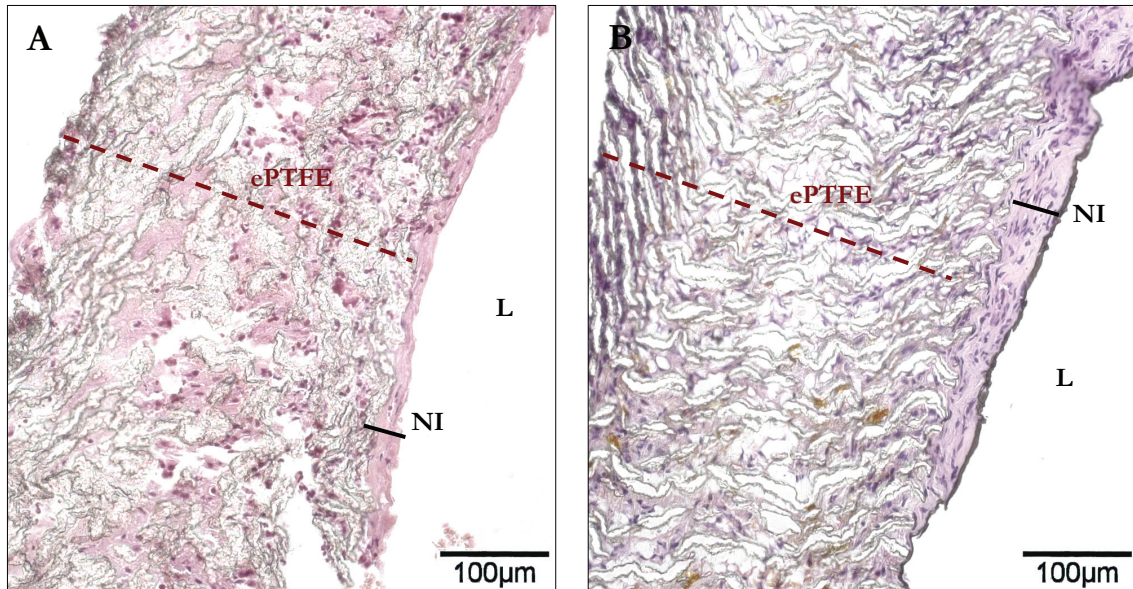


Figura 66: Histología de los constructos de ePTFE + HUVEC. **(A)** Espesor de la capa neointima en la región proximal del injerto (tinción HE, 200 aumentos). **(B)** Espesor de la neointima en la zona distal del injerto (tinción HE, 200 aumentos). L = Lumen; NI = Neointima.

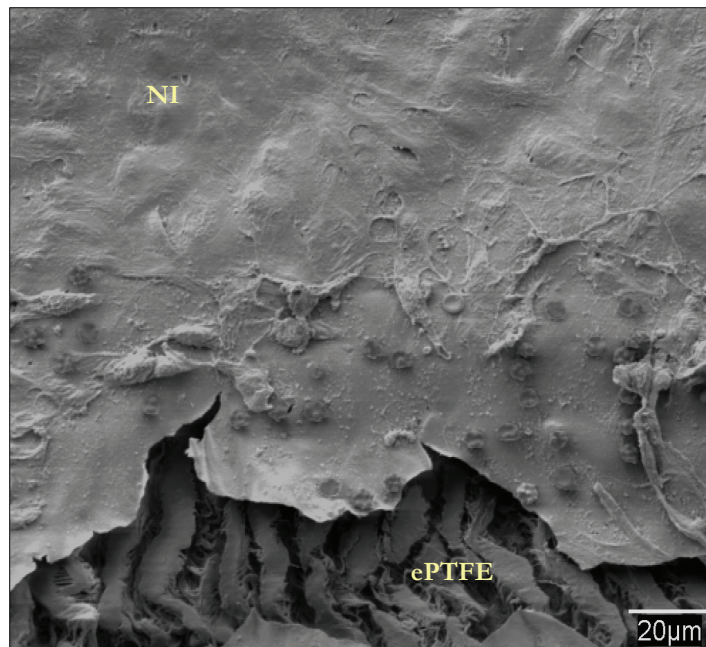


Figura 67: Lumen protésico de los constructos de ePTFE + HUVEC. Se aprecia una capa neointima muy desarrollada e intercalada con zonas desnudas que permiten vislumbrar el ePTFE subyacente (MEB, 500 aumentos). NI = Neointima.

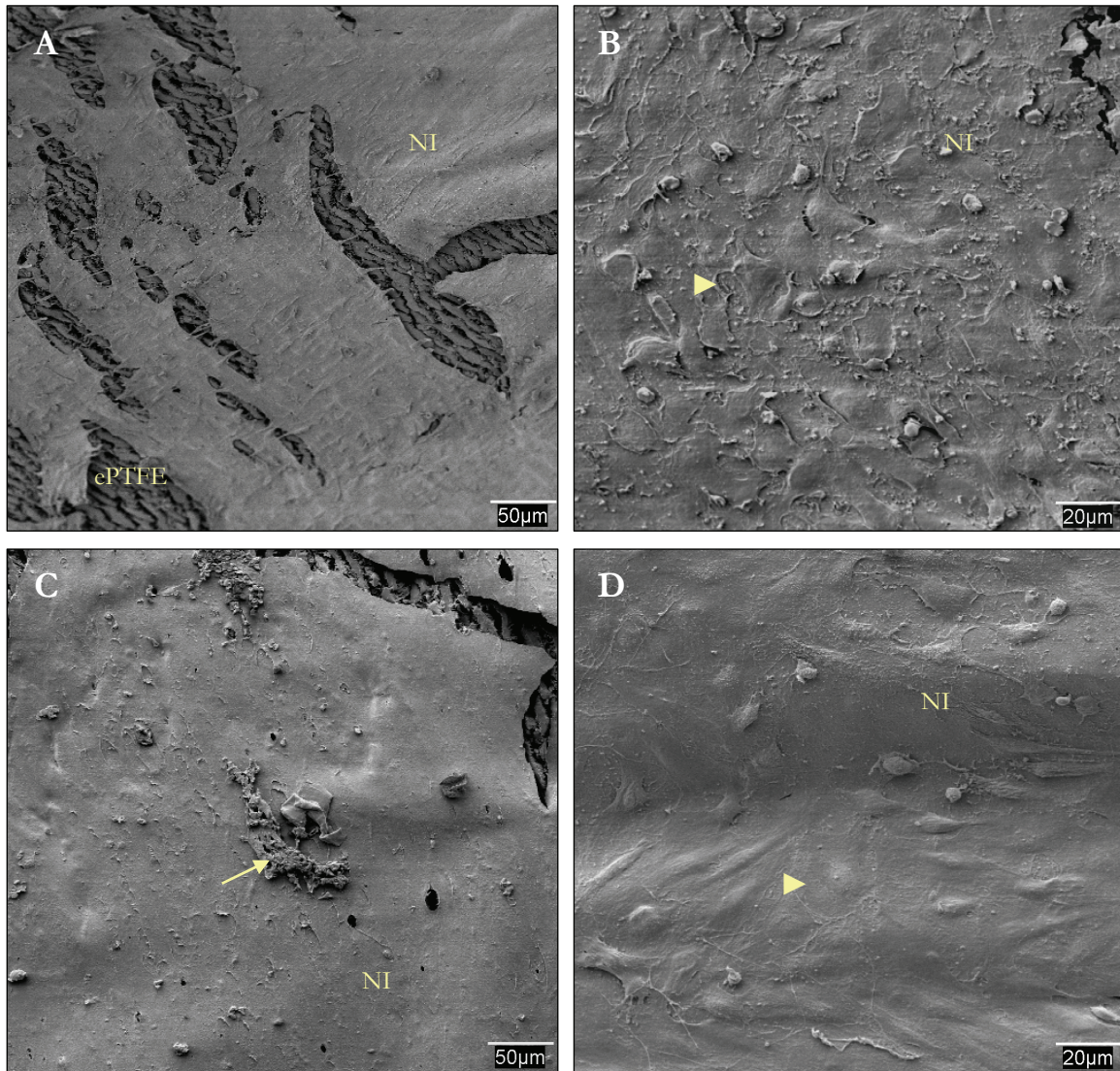


Figura 68: Lumen de los constructos de ePTFE + HUVEC en el eje proximal-distal. **(A, B)** Región proximal del injerto. La capa neoíntima recubre la superficie del biomaterial, salvo en algunas zonas denudadas. Las células de esta capa tienen morfología poligonal, característica de células endoteliales (►) (MEB, a 200 y 500 aumentos, respectivamente). **(C, D)** Región distal del injerto. Asociada a la capa neoíntimal, se observa la presencia de material trombogénico (→). Las células en esta zona mantienen el fenotipo poligonal (►) (MEB, a 200 y 500 aumentos, respectivamente). NI = Neoíntima.

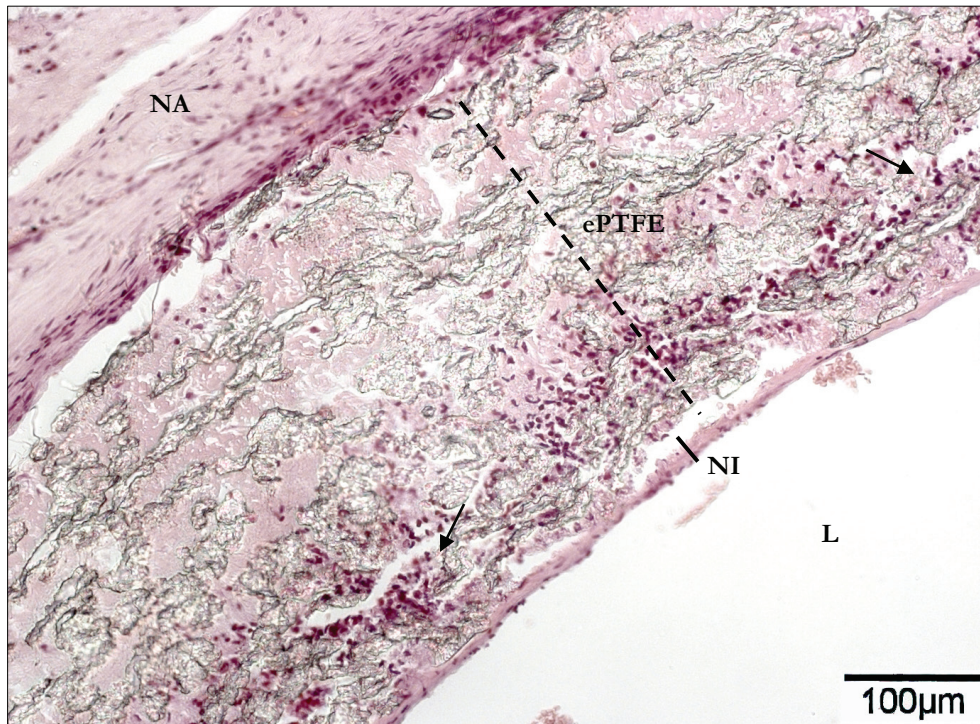


Figura 69: Infiltración celular en la pared de los constructos de ePTFE + HUVEC. En este tipo de injertos, la infiltración celular se produce especialmente en el tercio luminal del biomaterial (→) (tinción HE, 200 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia; NI = Neointima.

4.3.2.3 Grupo experimental III: ePTFE + WJC

El índice de trombosis de los constructos sembrados con WJC es ligeramente menor al observado en el grupo control (55%). Estos injertos están recubiertos por una fina capa neoadventicia. Es posible identificar macroscópicamente las regiones ocluidas, ya que la presencia de trombosis aporta a la pared del biomaterial una tonalidad más oscura [figura 70]. Uno de los injertos evaluados en este grupo experimental presenta una oclusión total del lumen protésico. El trombo que se ha desarrollado en su interior está recanalizado, permitiendo el paso de la sangre a través del constructo [figura 71].

Al analizar estos injertos mediante las técnicas histológicas convencionales, observamos que la capa neoadventicia que tapiza la superficie externa del biomaterial tiene un espesor variable a lo largo de toda su longitud. Esta capa neoadventicial está compuesta por abundantes fibras de colágeno, células en estado muy proliferativo y vascularización [figura 72].

En su superficie luminal, los constructos tienen zonas en las que el biomaterial se presenta desnudo. Estas zonas están intercaladas con otras en las que se ha desarrollado una hiperplasia intimal de espesor variable [figura 73]. En ocasiones, la hiperplasia intimal se encuentra asociada a trombosis debido a la presencia de unas estructuras tisulares con aspecto de tabique, que se prolongan perpendicularmente desde la capa neoíntima, entrando en contacto con el trombo hasta terminar formando parte de él .

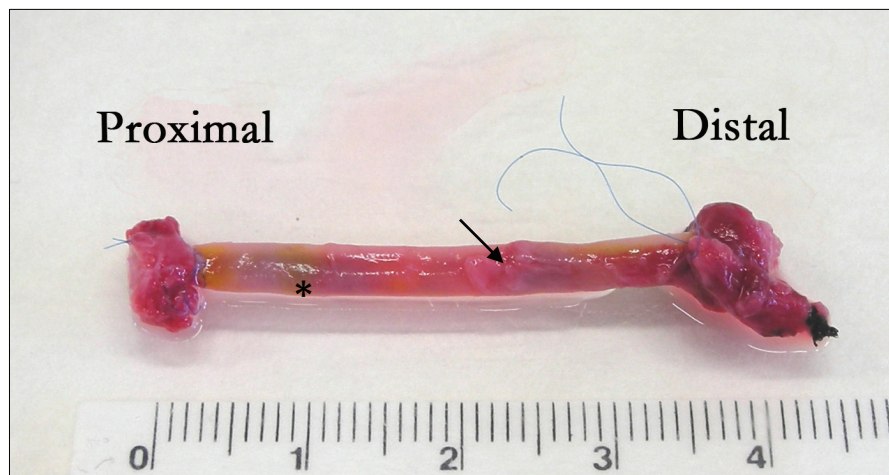


Figura 70: Imagen macroscópica de un injerto de ePTFE + WJC. Se observa la formación de una capa neoadventicia (→) y es posible identificar las regiones trombosadas del injerto gracias al cambio en la tonalidad de la pared del biomaterial (*).

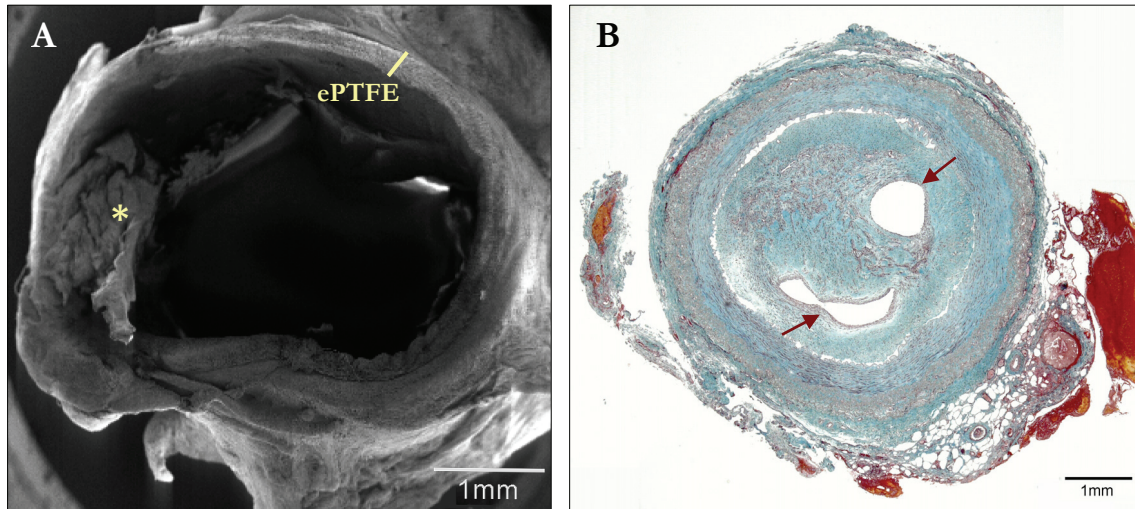


Figura 71: Aspecto de los injertos vasculares de ePTFE + WJC tras 60 días. **(A)** Injerto con oclusión parcial de la superficie luminal (*) (MEB, 12 aumentos). **(B)** Montaje panorámico de la región anastomótica proximal del injerto cuyo lumen está totalmente ocluido. El trombo tiene pequeñas recanalizaciones a través de las cuales circula el flujo sanguíneo (→) (tinción TM, imágenes originales tomadas a 50 aumentos).

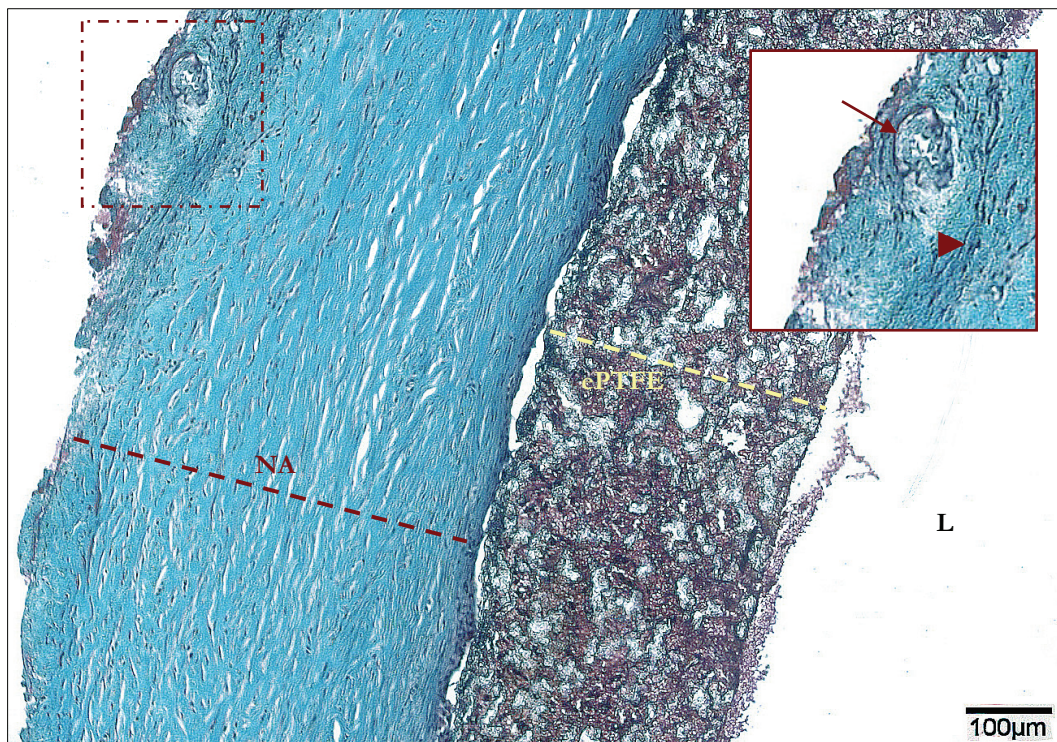


Figura 72: Histología de los constructos de ePTFE + WJC. Se puede observar la formación de una capa neoadventicial de gran espesor que tapiza externamente todo el biomaterial. La ampliación de la zona recuadrada permite destacar la presencia de células proliferativas (▶) y pequeños vasos sanguíneos (→) inmersos en la matriz de fibras de colágeno (tinción TM, 100 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia.

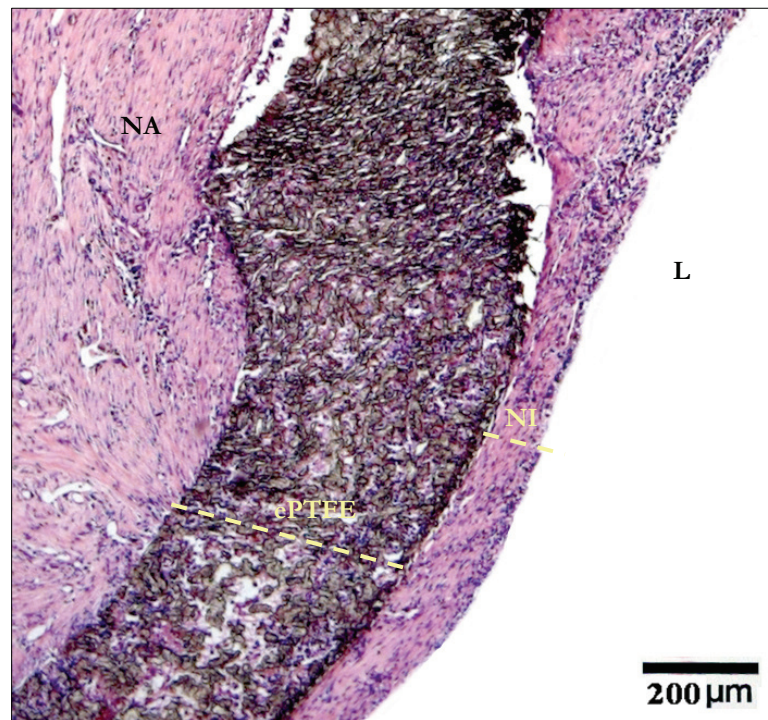


Figura 73: Histología de los constructos de ePTFE + WJC. En algunas zonas del injerto, la hiperplasia intimal provoca el desarrollo de una capa neointima que tapiza la superficie luminal del injerto (tinción HE, 50 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia; NI = Neointima.

Al analizar la región proximal de estos constructos bajo microscopía electrónica de barrido, observamos que la superficie luminal del biomaterial presenta una cubierta formada principalmente por redes de fibrina y hematíes. Cuando esta capa es removida del injerto, se puede apreciar la superficie del ePTFE subyacente. En las zonas ocluidas, el trombo se observa fuertemente organizado y anclado a la pared del ePTFE [figura 74].

El lumen del biomaterial está cubierto por una capa irregular formada por células, restos celulares, depósitos de fibrina y hematíes. Junto con estos componentes, es posible localizar macrófagos aislados [figura 75].

Esta capa irregular se observa también en la región central de los injertos. Además, en las zonas donde hay presencia de material trombogénico, se puede apreciar la estrecha conexión entre el trombo y la pared protésica [figura 76].

En la región distal, además de los depósitos de fibrina y hematíes, observamos una gran cantidad de restos celulares, sobre todo en las zonas más cercanas a la anastomosis [figura 77]. Estos restos celulares podrían corresponder con las WJC sembradas en el constructo, que han sido desprendidas del lumen protésico como consecuencia de la fuerza ejercida por el torrente sanguíneo a su paso por el interior del constructo.

La pared del ePTFE de estos injertos presenta una abundante infiltración celular en las zonas internodales del biomaterial, siendo especialmente intensa en los tercios luminal y adventicial [figura 78]. En algunas zonas, la infiltración es tan grande que se forman cordones celulares que atraviesan la pared del biomaterial, conectando los extremos luminal y adventicial.

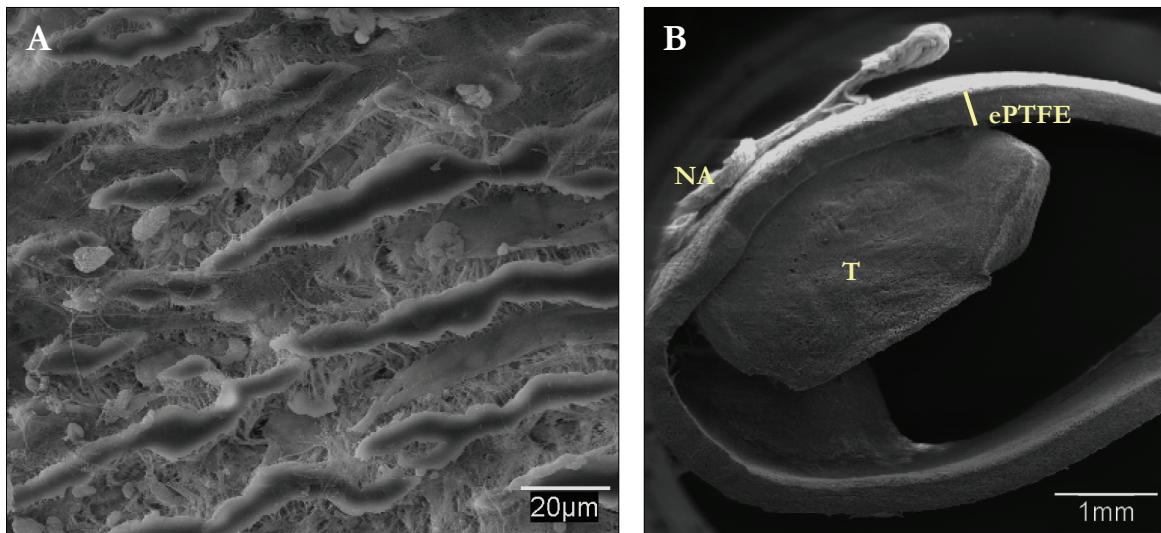


Figura 74: Región proximal de los injertos de ePTFE + WJC. **(A)** En las zonas desnudas se puede observar la estructura del ePTFE subyacente (MEB, 500 aumentos). **(B)** En las regiones con presencia de material trombogénico, éste se encuentra fuertemente anclado al lumen del biomaterial (MEB, 12 aumentos). NA = Neoadventicia; T = Trombosis.

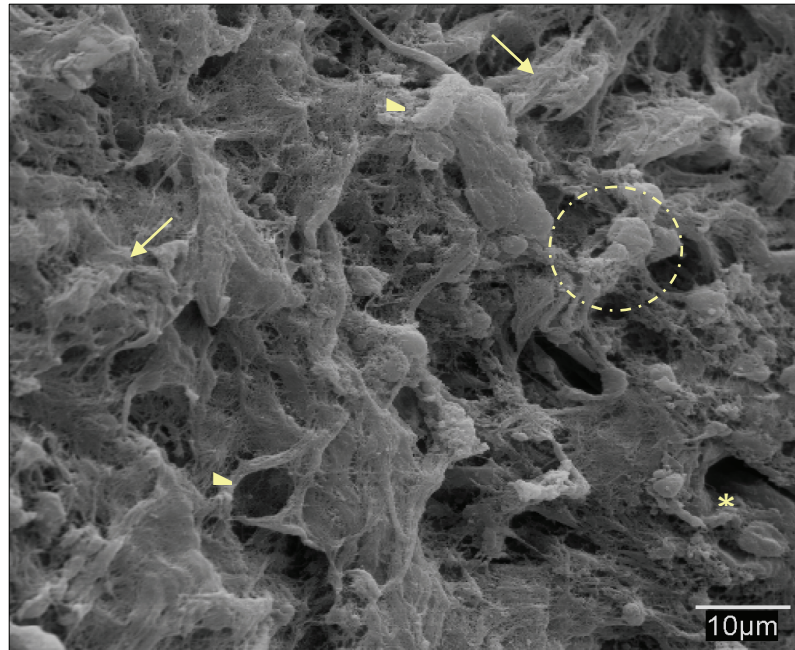


Figura 75: Región proximal de los injertos de ePTFE + WJC. El lumen del biomaterial se presenta cubierto por una capa irregular que contiene células (▶), restos celulares, depósitos de fibrina (→), hematíes (*) y macrófagos (----) (MEB, 1.000 aumentos).

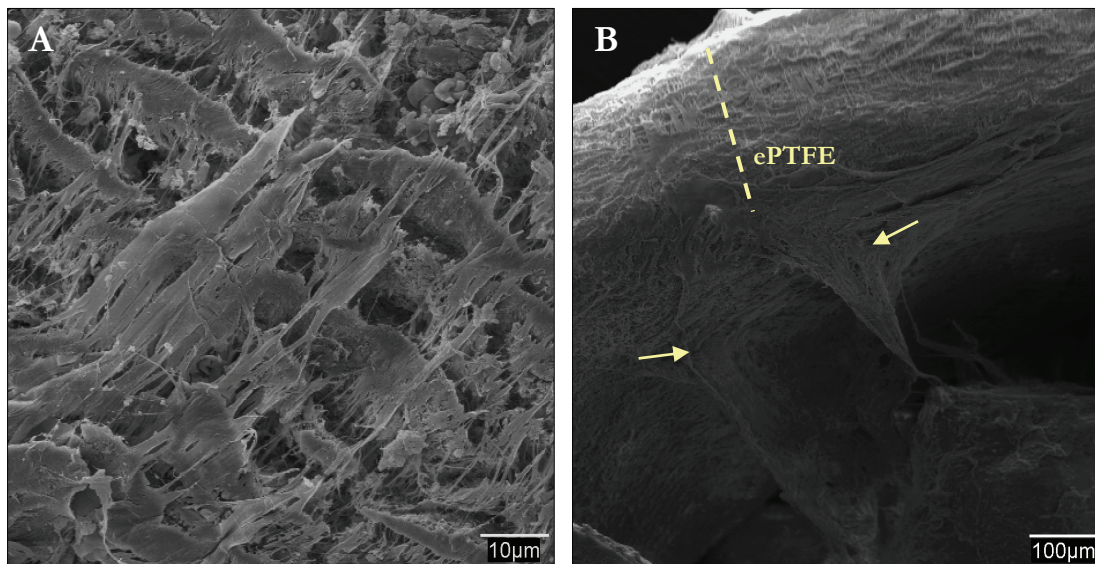


Figura 76: Región central de los injertos de ePTFE + WJC. **(A)** El aspecto de la superficie es muy similar a la observada en la región proximal del injerto (MEB, 1.000 aumentos). **(B)** Detalle de los depósitos de fibrina (→) que quedan adheridos a la pared del biomaterial (MEB, 100 aumentos).

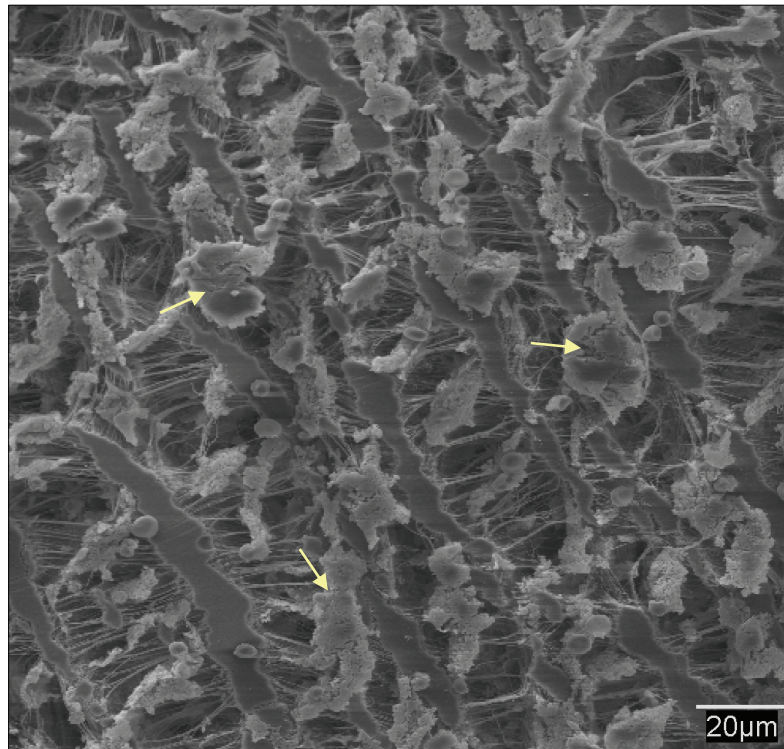


Figura 77: Región distal de los injertos de ePTFE + WJC. Se observa una gran cantidad de restos celulares (→), sobre todo en las zonas del injerto más próximas a la anastomosis distal (MEB, 500 aumentos).

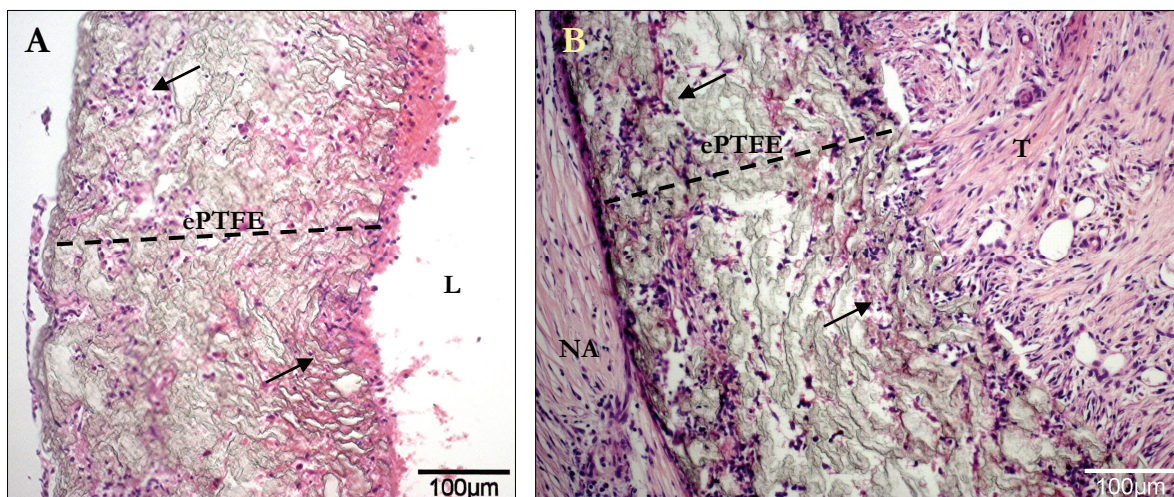


Figura 78: Infiltración celular en la pared de los constructos de ePTFE + WJC. A lo largo de todo el injerto, los tercios luminal y adventicial presentan una gran infiltración celular (→), tanto en **(A)** las zonas del injerto libres de trombosis como **(B)** las zonas ocluidas (tinción HE, ambas a 200 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia; T = Trombosis.

4.3.2.4 Grupo experimental IV: ePTFE + Dif-WJC

El aspecto macroscópico que presentan estos injertos es muy similar al observado en el anterior grupo experimental [figura 79], y muestran un menor porcentaje de trombosis (50%) que el grupo control y el sembrado con WJC.

El lumen protésico, desde su extremo proximal hasta el distal, aparece recubierto de una capa irregular en la que se distinguen acúmulos de fibrina y hematíes. En estos constructos es posible identificar una capa celular no homogénea que tapiza la superficie interna del biomaterial en varios puntos [figura 80]. Cuando esta capa se interrumpe, aparecen zonas desnudas y el ePTFE queda al descubierto y en contacto directo con el flujo sanguíneo [figura 81].

La capa neoadventicia que tapiza externamente estos constructos tiene gran cantidad de colágeno, está altamente vascularizada [figura 82] y su espesor es variable a lo largo de todo el injerto.



Figura 81: Imagen macroscópica de un injerto de ePTFE + Dif-WJC. Al igual que en el anterior grupo experimental, se observa la formación de una capa neoadventicia (→) y se identifican las regiones trombosadas del injerto gracias al cambio en la tonalidad de la pared del biomaterial (*).

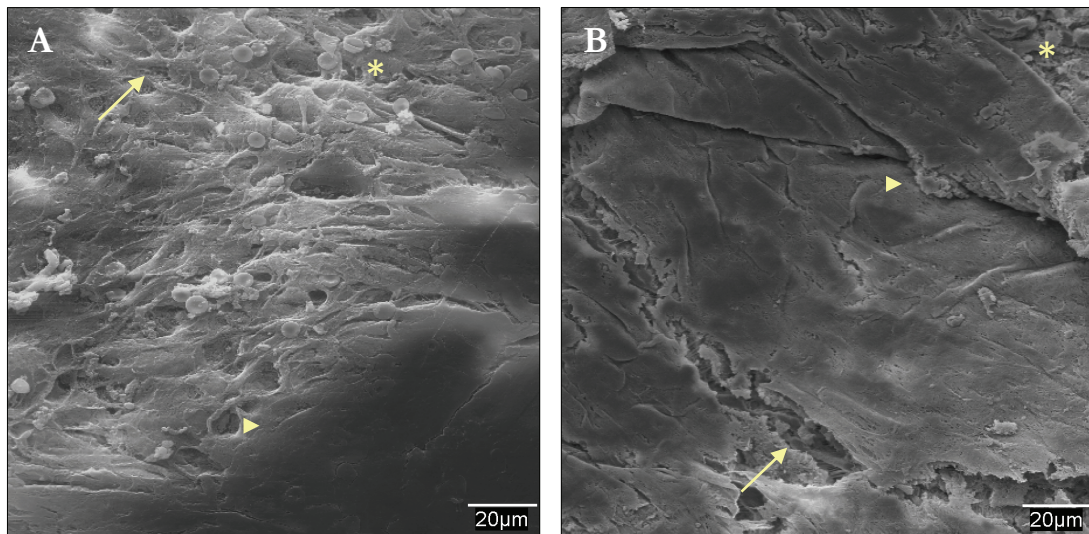


Figura 80: Lumen protésico de los constructos de ePTFE + Dif-WJC. **(A)** En la región proximal de los injertos se aprecia la capa de espesor variable que tapiza la superficie del biomaterial. Esta capa continúa en toda la longitud del constructo, **(B)** hasta llegar al extremo distal. Es posible distinguir los acúmulos de fibrina (→) y hematías (*) que acompañan a la capa celular formada (▴) (MEB, ambas a 500 aumentos).

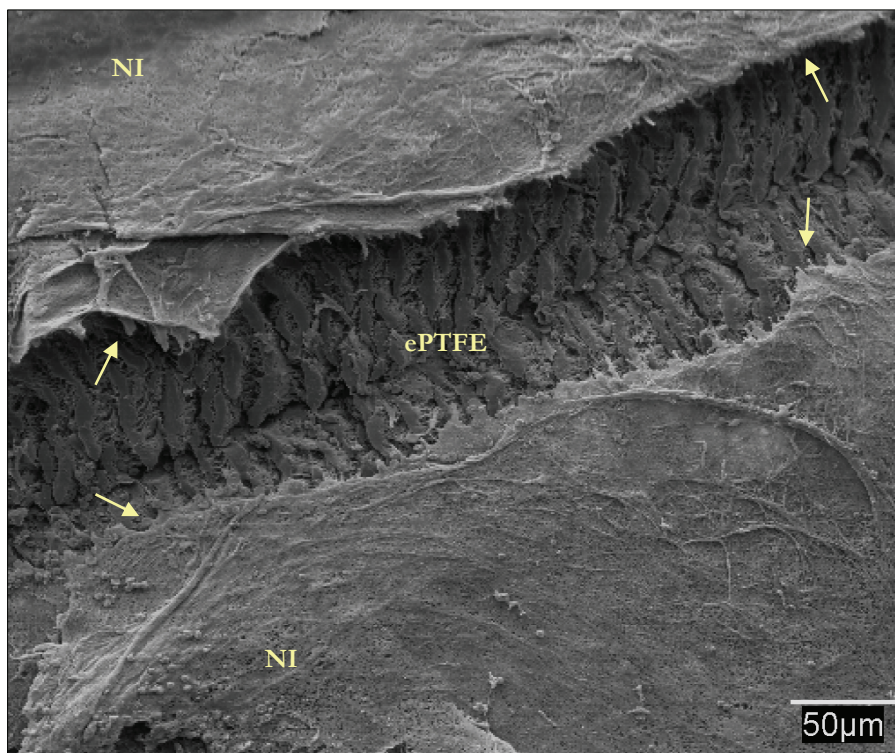


Figura 81: Lumen protésico de los constructos de ePTFE + Dif-WJC. En las zonas denudadas, la lengüeta de células, fibrina y hematías que tapiza la superficie luminal del injerto se interrumpe (→), dejando al biomaterial en contacto directo con el flujo sanguíneo (MEB, 200 aumentos). NI = Neointima.

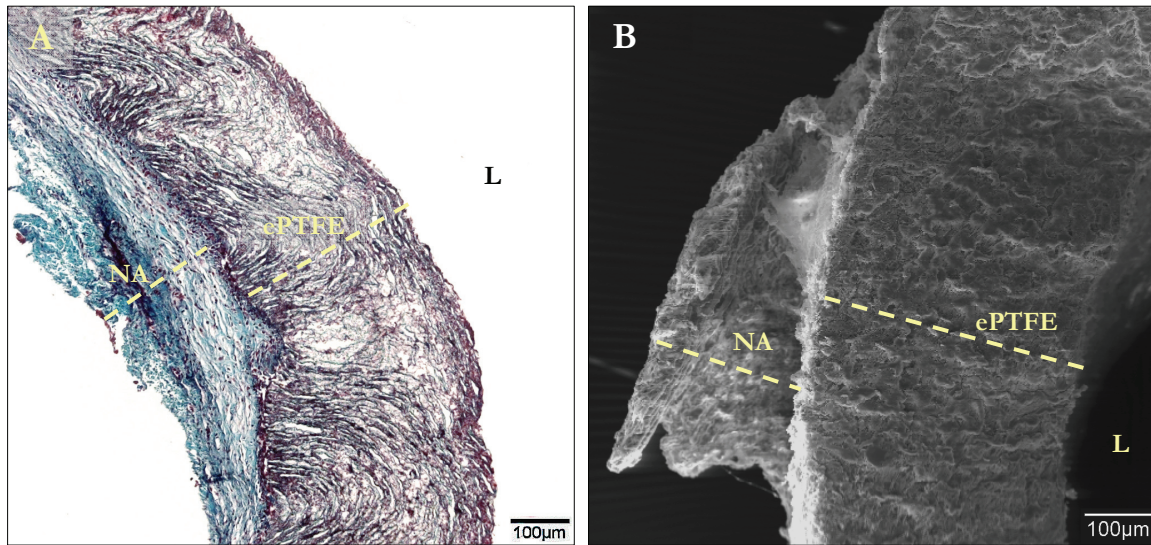


Figura 82: Histología de los constructos de ePTFE + Dif-WJC. **(A)** La neoadventicia formada contiene gran cantidad de fibras de colágeno (tinción TM, 100 aumentos). **(B)** Aspecto de la superficie de la neoadventicia (MEB, 100 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia.

En la superficie luminal de estos constructos se puede observar una fina capa neoíntima que tapiza interiormente al biomaterial, y presenta un espesor homogéneo a lo largo de la mayoría de la longitud del implante [figura 83].

En las regiones del constructo ocluidas, se puede comprobar que la pared del biomaterial carece de capa neoíntima, y el trombo está en contacto directo con el lumen protésico. Estas zonas en las que el trombo interacciona directamente con el ePTFE podrían corresponder con las regiones denudadas del constructo que observamos previamente a microscopía electrónica de barrido [figura 81].

Finalmente, la pared del biomaterial de estos injertos está abundantemente infiltrada, y en algunos puntos las células forman densos cordones que rellenan los espacios internodales, comunicando las superficies luminal y adventicial del biomaterial [figura 84].

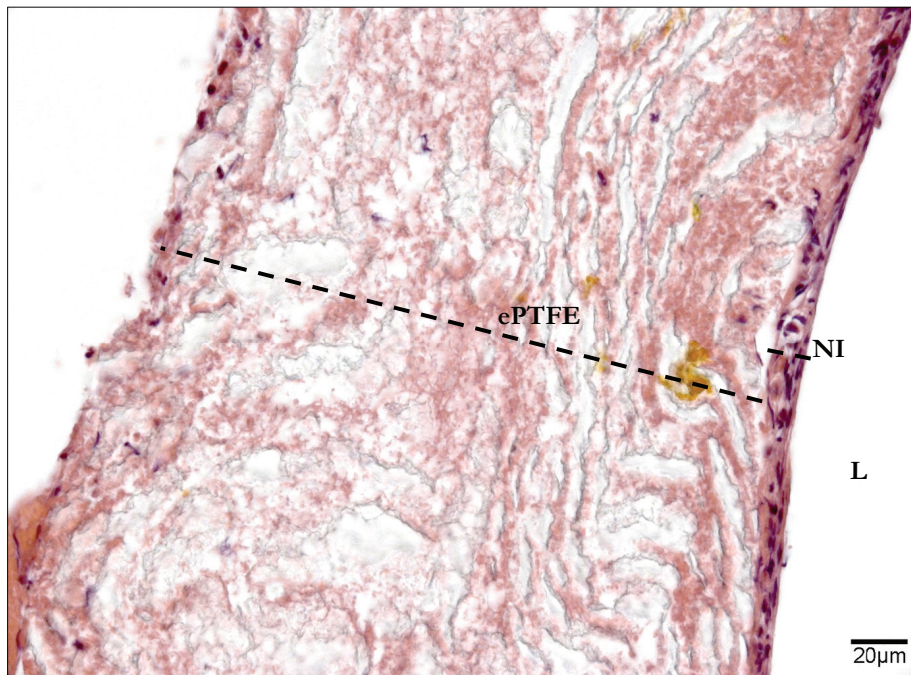


Figura 83: Histología de los constructos de ePTFE + Dif-WJC. La capa neointima que se forma en estos injertos tiene un espesor homogéneo a lo largo de gran parte de su superficie luminal (tinción HE, 400 aumentos). L = Lumen; NI = Neointima.

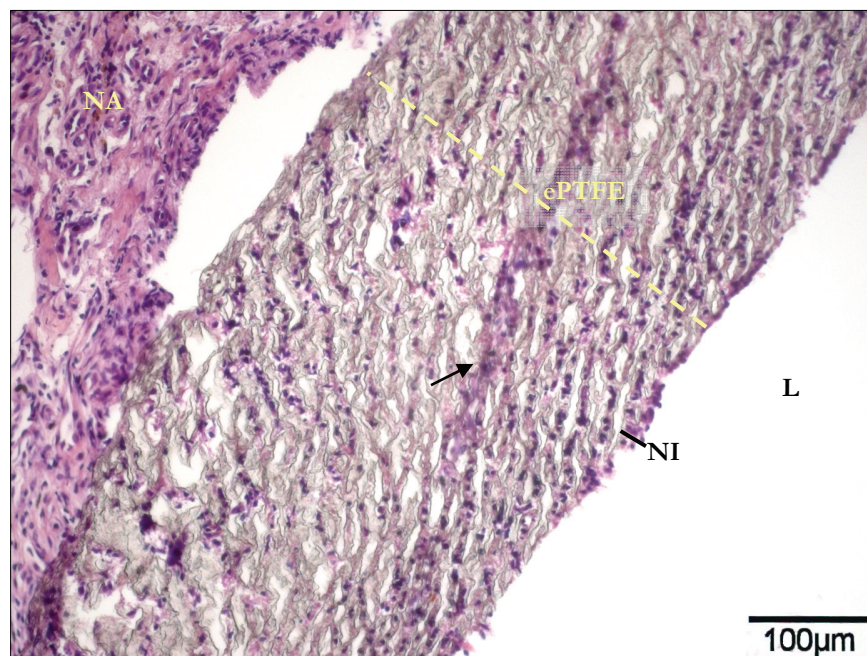


Figura 84: Infiltración celular en la pared de los constructos de ePTFE + Dif-WJC. La infiltración celular que se observa en este tipo de injertos es muy intensa. Las células forman densos cordones (→) que comunican las superficies luminal y adventicial en algunas regiones del biomaterial (tinción HE, 200 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia; NI = Neointima.

4.3.3 Cuantificación de la hiperplasia intimal

Los grupos experimentales incluidos en este estudio, tanto el grupo control como los sembrados con HUVEC, WJC y Dif-WJC, presentan un crecimiento hiperplásico de la capa neoíntima que tapiza en mayor o menor grado la superficie luminal de los constructos.

Al realizar mediciones del espesor de la neoíntima en las distintas regiones de los constructos, comprobamos que esta capa incrementa de grosor a medida que se aproxima a la anastomosis distal.

Partiendo desde el extremo proximal, el grupo control es el que presenta un mayor crecimiento hiperplásico, con valores estadísticamente significativos entre las tres regiones proximal, central y distal (** $p < 0,001$). Observamos un comportamiento similar en los constructos sembrados con HUVEC (** $p < 0,001$), con la particularidad de que el espesor de la neoíntima es notablemente menor en este caso.

En el caso del grupo experimental de ePTFE + WJC, podemos apreciar un incremento en espesor desde la región central del injerto, aunque éste no alcanza niveles estadísticamente significativos hasta alcanzar el extremo distal ($p < 0,05$).

Los constructos sembrados con Dif-WJC, tienen un bajo crecimiento de la neoíntima, si bien los valores medios obtenidos presentan diferencias significativas entre los extremos proximal-central ($p < 0,05$) y proximal-distal (** $p < 0,01$) [figura 85].

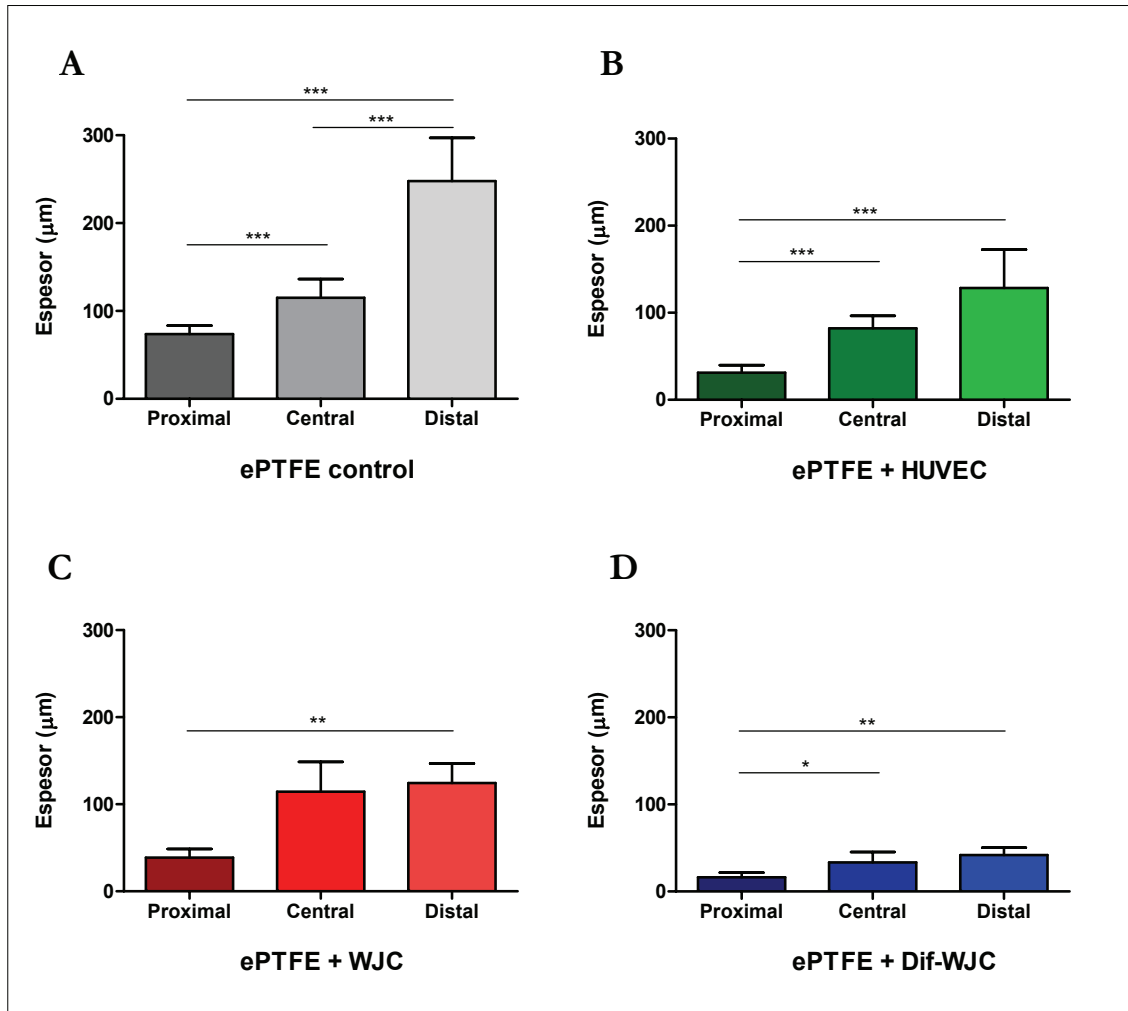


Figura 85: Espesor de la capa neointima en los diferentes grupos experimentales. **(A)** Constructos de ePTFE control, con incremento significativo entre las tres regiones, proximal, central y distal (** $p < 0,001$). **(B)** Constructos de ePTFE + HUVEC, con un incremento significativo entre las regiones proximal-central y proximal-distal (** $p < 0,001$). **(C)** Constructos de ePTFE + WJC, con un incremento significativo entre los extremos proximal y distal (** $p < 0,01$). **(D)** Constructos de ePTFE + Dif-WJC, con un incremento significativo entre las regiones proximal-central ($p < 0,05$) y proximal-distal (** $p < 0,01$).

Al analizar independientemente los tercios proximal, central y distal, observamos que en todos los casos el grupo control es el que presenta una mayor hiperplasia, mientras que los constructos sembrados con Dif-WJC son los que tienen la capa neointimal más delgada.

En el tercio proximal, la neointima del grupo control es significativamente mayor que la presente en los grupos sembrados con WJC (** $p < 0,01$), Dif-WJC (** $p < 0,001$) y HUVEC (** $p < 0,001$). Los constructos con Dif-WJC presentan a su vez una hiperplasia intimal significativamente menor que los grupos WJC (** $p < 0,01$) y HUVEC (** $p < 0,001$).

En el tercio central, la neointima del grupo control es significativamente mayor que la de los grupos Dif-WJC (** $p < 0,01$) y HUVEC (* $p < 0,05$). Aunque la hiperplasia de los constructos sembrados con Dif-WJC es más delgada que los demás grupos, únicamente presenta diferencias estadísticamente relevantes en comparación con el grupo sembrado con HUVEC (* $p < 0,05$).

En el tercio distal, el espesor de la capa neointima del grupo control es muy elevado, alcanzando valores que presentan distintos niveles de significatividad en comparación con los demás grupos, sembrados con WJC (** $p < 0,001$), Dif-WJC (** $p < 0,001$) y HUVEC (* $p < 0,05$) [figura 86].

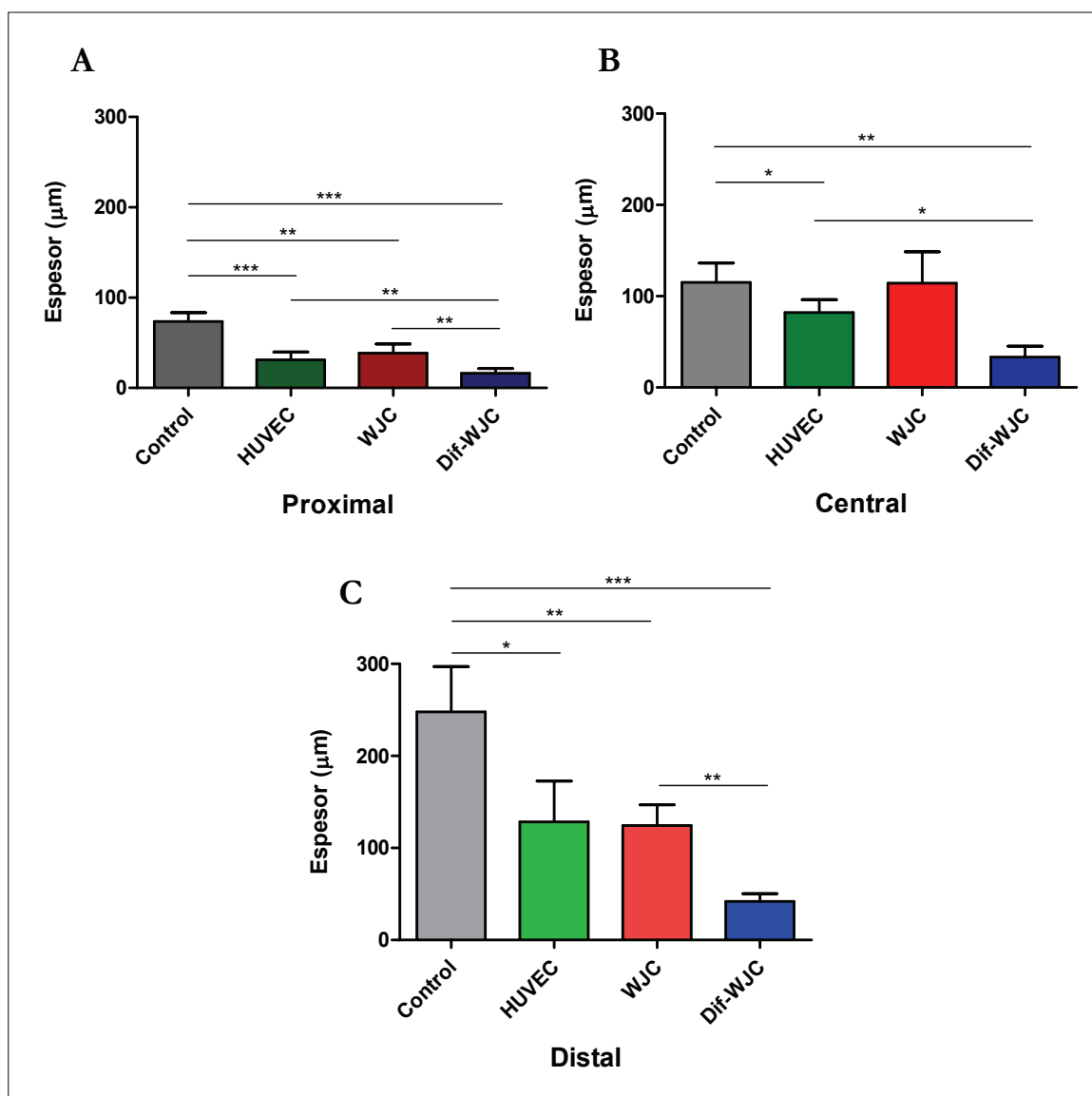


Figura 86: Espesor de la capa neointima en los tercios proximal, central y distal. En todos ellos el grupo control es el de mayor espesor, y el grupo Dif-WJC el menor. **(A)** En la región proximal, el grupo control es significativamente mayor que los grupos WJC (**p<0,01), Dif-WJC y HUVEC (***p<0,001). La hiperplasia del grupo Dif-WJC es menor que la de los grupos WJC y HUVEC (**p<0,01). **(B)** En la región central, el grupo control es significativamente mayor que los grupos Dif-WJC (**p<0,01) y HUVEC (*p<0,05). La hiperplasia del grupo Dif-WJC es significativamente menor que la de HUVEC (*p<0,05). **(C)** En la región distal, la hiperplasia del grupo control es muy espesa, con diferencias significativas con los grupos WJC (**p<0,01), Dif-WJC (***p<0,001) y HUVEC (*p<0,05). El grupo Dif-WJC es significativamente menor que el WJC (**p<0,01).

Las diferencias que hemos encontrado en cuanto al espesor de la capa neointima en los distintos grupos experimentales no sólo se aprecia entre los tercios proximal, central y distal, sino que se pueden observar de forma global. Es importante destacar que el espesor de esta capa neoformada en los constructos sembrados con Dif-WJC es significativamente menor que la de los demás grupos experimentales, especialmente en comparación con el grupo control (** $p < 0,001$) [figura 87].

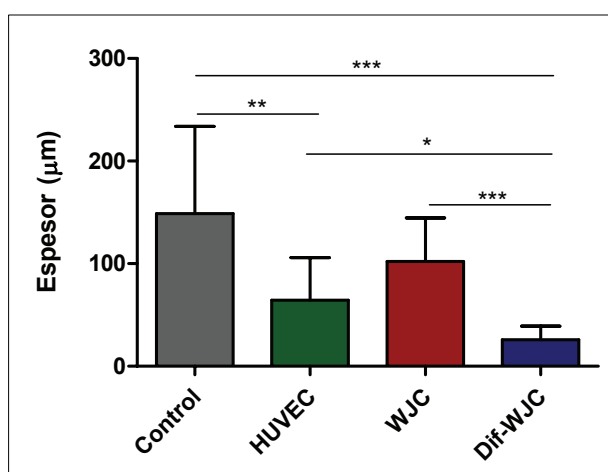


Figura 87: Espesor medio de la capa neointima en los distintos grupos experimentales. Observamos que el grupo sembrado con Dif-WJC presenta diferencias significativas con los tres grupos, control (** $p < 0,001$), HUVEC ($p < 0,05$) y WJC (** $p < 0,001$).

En la siguiente tabla se reflejan los valores medios correspondientes al espesor de la capa neointima, medida en todos los grupos de estudio en los tercios proximal, central y distal [tabla 14].

Grupo experimental	Tercio proximal (μm)	Tercio central (μm)	Tercio distal (μm)
ePTFE control	73,70 \pm 9,75	115,19 \pm 21,25	247,79 \pm 49,29
ePTFE + HUVEC	31,18 \pm 8,61	82,02 \pm 14,27	128,43 \pm 44,17
ePTFE + WJC	38,67 \pm 10,03	114,37 \pm 34,33	124,39 \pm 22,43
ePTFE + Dif-WJC	16,42 \pm 5,25	33,32 \pm 11,96	41,88 \pm 8,55

Tabla 14: Tabla resumen con los valores de la media \pm desviación típica correspondientes al espesor de la capa neointima (μm) medida para cada grupo experimental en los tercios proximal, central y distal.

4.3.4 Reacción macrofágica

La reacción a cuerpo extraño que provoca el biomaterial de ePTFE tras ser implantado en el territorio arterial se observa principalmente en la superficie más adventicial de los constructos. Todos los constructos evaluados de los diferentes grupos experimentales presentan el mismo comportamiento: en ellos se observa la formación de una capa fibrosa que se dispone alrededor del ePTFE, encapsulándolo parcialmente.

Los macrófagos presentes en esta cápsula fibrosa son muy reactivos en las regiones perianastomóticas de los tercios proximal y distal. En estos extremos del constructo los macrófagos activados migran hacia el interior del ePTFE, llegando a colonizar toda la pared protésica desde el extremo adventicial hacia el luminal [figura 88].

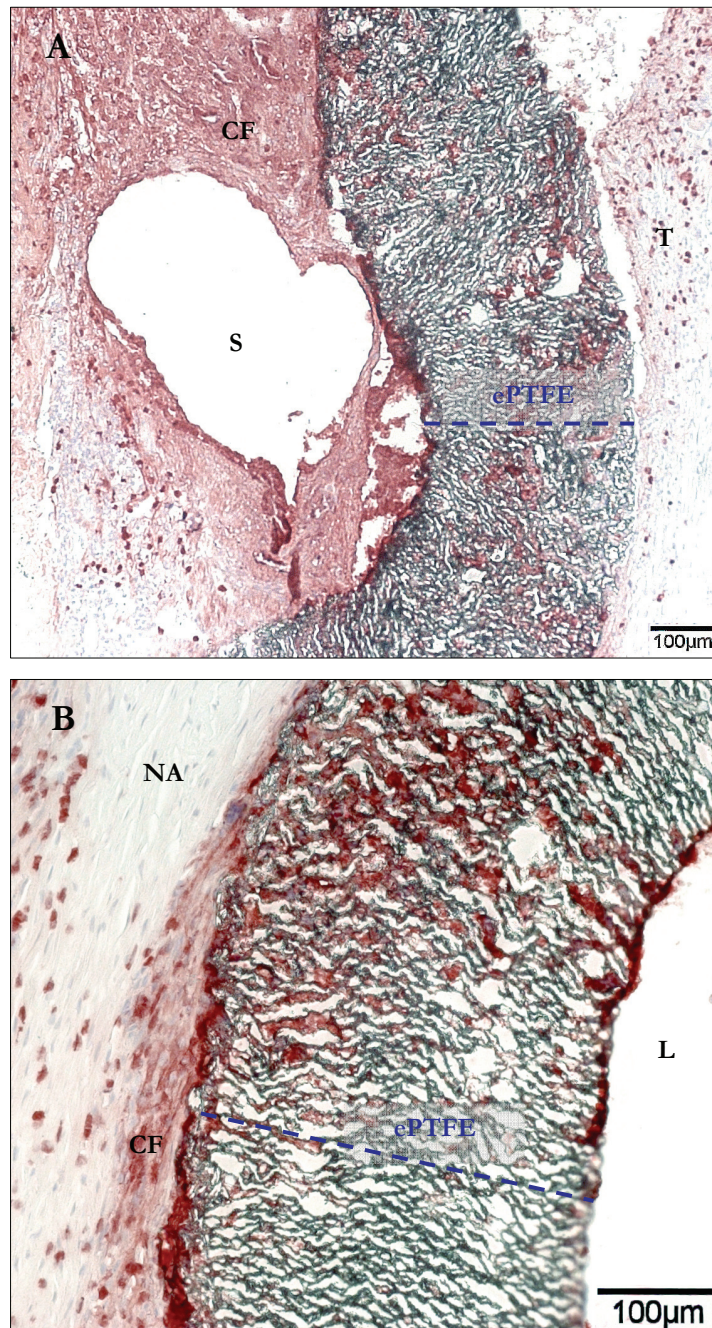


Figura 88: Reacción macrofágica en las regiones perianastomóticas. **(A)** Anastomosis proximal. Se observa una cápsula fibrosa reactiva que rodea al biomaterial en el borde de sutura, en la que hay una abundante presencia de macrófagos activados, revelados en color rojo. La superficie luminal del injerto, ligeramente trombosada, presenta gran número de macrófagos activados (inmunohistoquímica, IH, 100 aumentos). **(B)** Anastomosis distal. Los macrófagos activados migran de la cápsula fibrosa en dirección al biomaterial, llegando a colonizar toda su pared hasta alcanzar el extremo luminal (IH, 200 aumentos). CF = Cápsula fibrosa; L = Lumen; NA = Neoadventicia; S = Sutura.

En el tercio central del injerto, la reacción macrofágica es más leve. La cápsula fibrosa presente en esta zona es menos reactiva, y el porcentaje de macrófagos activados se corresponde tan sólo con el 5% ($4,93 \pm 0,71\%$) del total de las células infiltradas en la pared del ePTFE [figura 89].

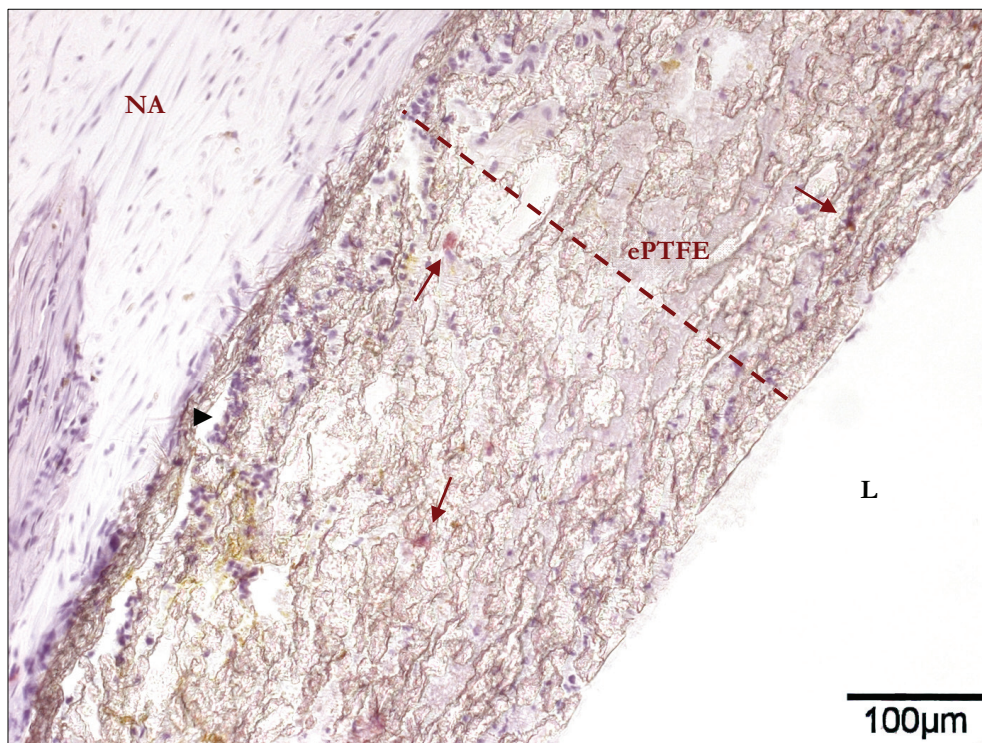


Figura 89: Reacción macrofágica en el tercio central de los injertos. A pesar de la infiltración celular tan abundante, el porcentaje de macrófagos activados presentes en el interior del ePTFE (\rightarrow) es muy escaso en comparación con el total de células presentes en el biomaterial (\blacktriangleright) (IH, 200 aumentos). L = Lumen; NA = Neoadventicia.

4.3.5 Remodelación de la pared protésica

La arteria femoral receptora presenta una abundante disposición de colágeno a lo largo de toda la pared vascular. La túnica media contiene fundamentalmente colágeno de tipo I, mientras que en la túnica adventicia predomina el colágeno de tipo III,

aunque también es posible identificar pequeños haces de colágeno I. Las fibras elásticas presentes en la arteria se observan con una tonalidad blanquecina [figura 90].

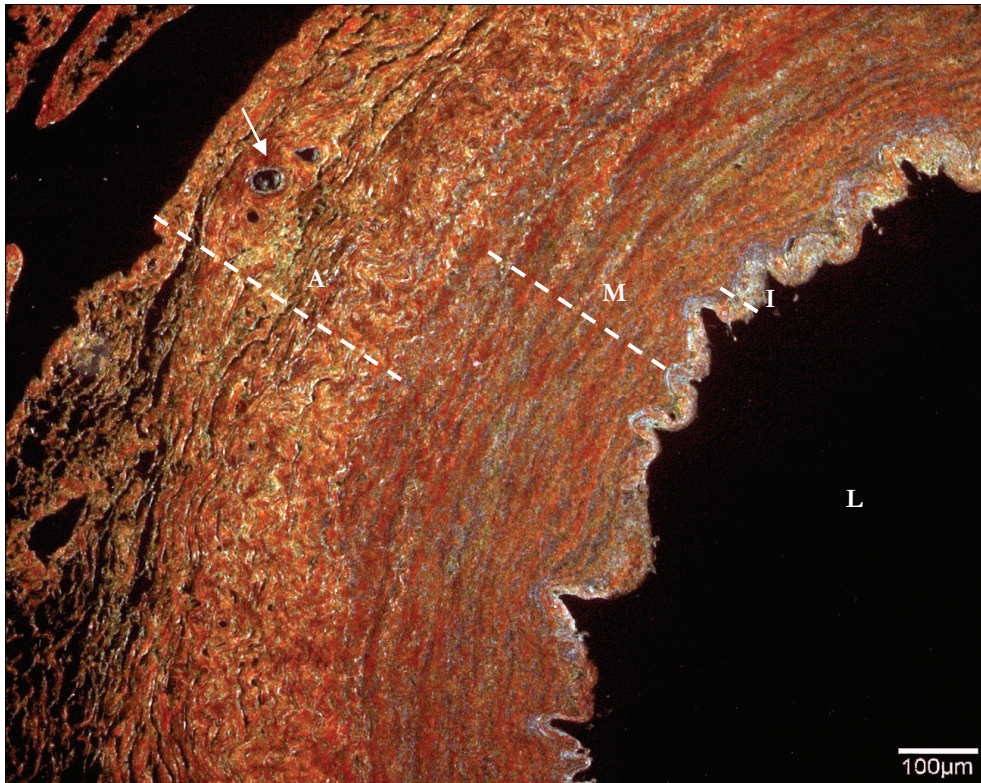


Figura 90: Organización de las fibras de colágeno en la pared arterial receptora. El colágeno maduro (tipo I) se localiza principalmente en la túnica media, mientras que el colágeno inmaduro (tipo III) predomina en la túnica adventicia. Se observa presencia de microvasculatura en la túnica adventicia (→). Las fibras elásticas presentes en el tejido aparecen con una tonalidad blanquecina (tinción RS, 100 aumentos). A = Túnica adventicia; I = Túnica íntima; L = Lumen; M = Túnica media.

A la hora de evaluar los constructos, comprobamos que la integración tisular de los mismos se desarrolla de manera similar en todos ellos, con independencia de si el biomaterial carece o presenta siembra celular en su superficie luminal, así como de la estirpe celular sembrada.

Morfológicamente, los constructos de todos los grupos de estudio presentan una disposición en “sándwich” en la que se distinguen claramente dos vertientes -adventicial y luminal- entre las cuales se dispone el biomaterial.

La capa adventicial neoformada que rodea a estos implantes en su vertiente externa, presenta una combinación de fibras de colágeno inmaduras (colágeno III) y maduras (colágeno I). El colágeno de tipo I predomina en todos los grupos experimentales, a excepción de los constructos sembrados con WJC, en los que se observa un mayor depósito de fibras de colágeno de tipo III [figura 91]. Esta diferencia hace que la neoadventicia formada en los constructos de ePTFE + WJC sea la que más se asemeja desde un punto de vista estructural a la túnica adventicia de la arteria receptora.

En la vertiente luminal de todos los grupos de estudio observamos que la capa neointima tiene una leve presencia de componente colágeno maduro de tipo I, la cual se vuelve notablemente más acusada en la interfase biomaterial-neointima [figura 91].

Finalmente, la pared del ePTFE apenas presenta infiltración de redes de colágeno en sus zonas internodales, lo que contrasta con la colonización celular documentada previamente [figura 91].

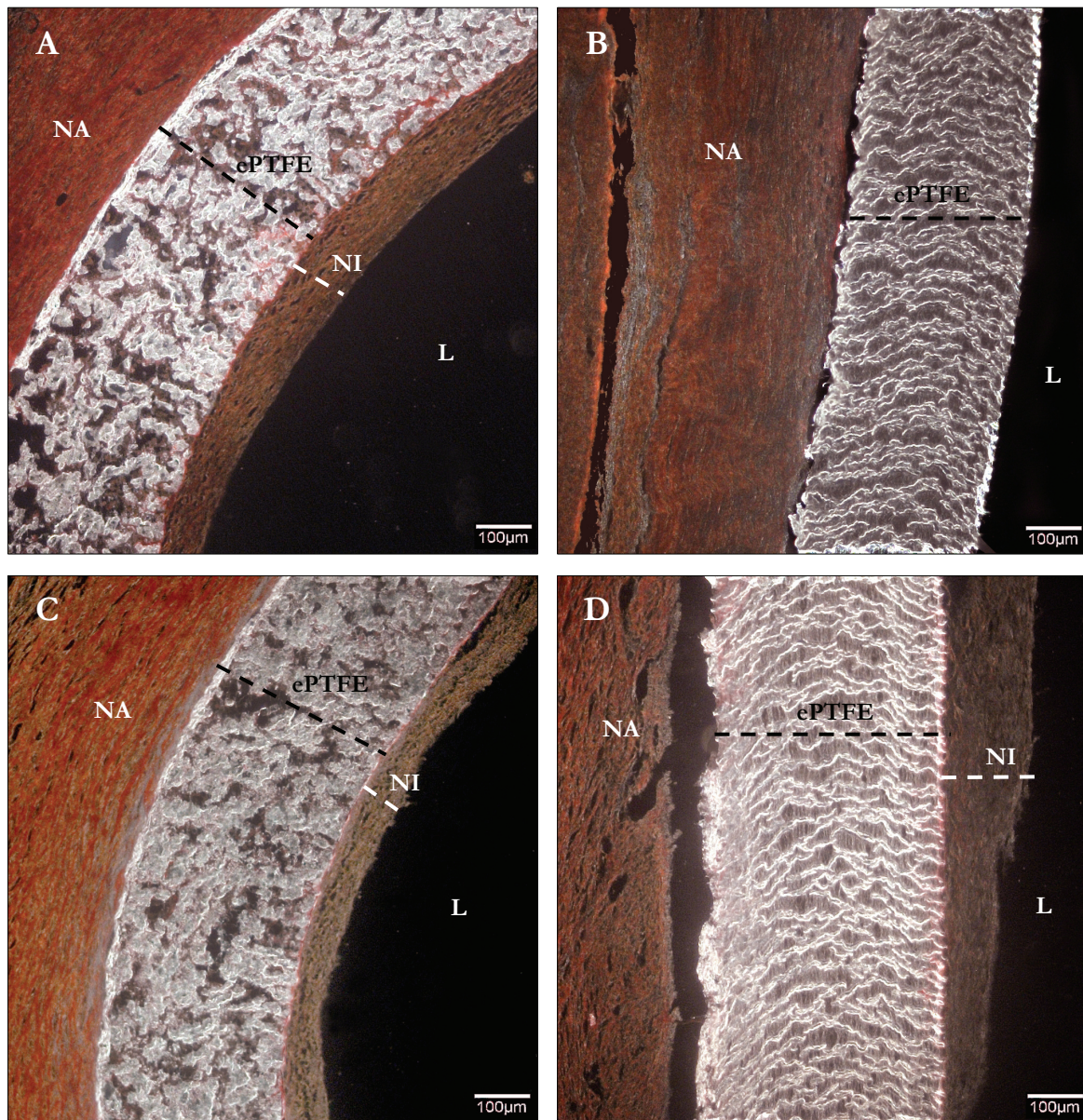


Figura 91: Remodelación tisular de los constructos vasculares. **(A)** Constructos de ePTFE control. La neoadventicia está formada principalmente por colágeno maduro (tipo I). Se observa una ligera presencia de colágeno maduro en la capa neointima, con infiltración de redes de colágeno en el interior del biomaterial (→). **(B)** Constructos de ePTFE + HUVEC. La composición de la neoadventicia es similar a la del grupo anterior. **(C)** Constructos de ePTFE + WJC. En la vertiente adventicial predomina el colágeno inmaduro (tipo III), de forma similar a lo ocurrido en el tejido nativo. **(D)** Constructos de ePTFE + Dif-WJC. La composición de la neoadventicia es fundamentalmente de colágeno maduro (tipo I) (tinción RS, todas a 100 aumentos). NA = Neoadventicia; NI = Neointima; L = Lumen.

4.4 RESUMEN DE RESULTADOS OBJETIVO 2

Los resultados más relevantes obtenidos tras validar los diferentes constructos vasculares se pueden resumir de la siguiente forma:

1. Las estirpes celulares HUVEC, WJC y Dif-WJC presentan la capacidad de adherirse a la superficie luminal de biomateriales de ePTFE pretratados con fibronectina. Bajo condiciones estáticas de cultivo, estas poblaciones se organizan sobre el lumen protésico formando una capa celular más o menos estable.
2. Cuando los constructos vasculares se interponen en un circuito de flujo pulsátil, las fuerzas de cizallamiento “shear-stress” generadas por las propias condiciones del flujo, ejercen una presión sobre las células, provocando el desanclaje de gran parte de las mismas.
3. La efectividad de los constructos sembrados con WJC y Dif-WJC como sustitutos vasculares en un modelo animal de sustitución arterial, aunque algo inferior a la de los constructos sembrados con HUVEC, es superior a lo observado en el grupo control, en el que el ePTFE carece de siembra celular.
4. El espesor de la capa neointimal de los grupos experimentales sembrados con WJC y Dif-WJC es sensiblemente menor al presente en el grupo de HUVEC.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a índice de trombosis y formación de hiperplasia intimal, podemos afirmar que, a pesar de que las células obtenidas de la gelatina de Wharton no alcanzan un comportamiento similar al de las células endoteliales de cordón umbilical, sí mejoran el comportamiento de los injertos vasculares sin tratamiento celular previo.

La disminución del espesor de la capa mioíntimal observado en el grupo experimental sembrado con Dif-WJC podría explicarse porque las células procedentes de la gelatina de Wharton tengan una diferenciación más eficiente hacia la estirpe muscular que hacia la estirpe endotelial, facilitando la creación de esta capa mioíntima precoz, que podría inhibir la proliferación y migración de las células musculares lisas de la túnica media de los extremos receptores.

Capítulo 5

Discusión

5.1 MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

5.1.1 Aislamiento de células del cordón umbilical

El cordón umbilical constituye una de las fuentes más clásicas para la obtención de células de diversa índole. En comparación con otros tejidos del organismo, el cordón ofrece una serie de ventajas que hacen de él una herramienta muy atractiva tanto para la investigación como para la clínica: éste es un tejido que no requiere de técnicas invasivas para su obtención; su manipulación no supone grandes controversias éticas debido a su naturaleza extraembrionaria; y se puede disponer de él de forma prácticamente inagotable y a un bajo coste económico (Weiss y Troyer, 2006). A pesar de esto, es importante tener en cuenta que existen una serie de variables difíciles de controlar que pueden afectar a la viabilidad de las células que se pretendan aislar del tejido, como por ejemplo el estrés fetal durante el parto, la anestesia administrada a la madre, y el periodo de anoxia que sufre el cordón durante el transporte al laboratorio (Gimbrone y cols., 1974).

Las células endoteliales de vena umbilical son una de las primeras estirpes aisladas a partir de este tejido (Jaffe y cols., 1973). Junto a ellas, es posible obtener otras poblaciones celulares diferenciadas de varias regiones del cordón. Así, en las últimas décadas, se ha logrado aislar células musculares lisas de la túnica media de los vasos (Heimli y cols., 1997) y células del epitelio umbilical (Sanmano y cols., 2005). También es posible aislar poblaciones celulares indiferenciadas del subendotelio venoso (Covas y cols., 2003; Ennis y cols., 2008b), la membrana subamniótica (Kita y cols., 2010) y la gelatina de Wharton (McElreavey y cols., 1991). Finalmente, a partir de la sangre umbilical, se obtienen poblaciones de células endoteliales progenitoras (Brown y cols., 2009), células madre precursoras de la línea hematopoyética (Chularojmontri y Wattanapitayakul, 2009) y células mesenquimales no hematopoyéticas (Bieback y cols., 2004; Lee y cols., 2004).

De todo este amplio abanico, las estirpes celulares que hemos seleccionado para llevar a cabo nuestros experimentos han sido las células endoteliales de vena umbilical (HUVEC) y las células de la gelatina de Wharton (WJC). El primer objetivo que nos hemos planteado consiste en aislar ambas estirpes, caracterizarlas, evaluar su crecimiento en cultivo, analizar su expresión génica, y finalmente validar el potencial de diferenciación endotelial de la población WJC, comparándola con las células endoteliales nativas HUVEC.

El protocolo de aislamiento de las HUVEC está muy bien definido gracias a los trabajos que Jaffe y colaboradores llevaron a cabo en la década de los 70 (Jaffe y cols., 1973; Jaffe y cols., 1974). Sin embargo, no sucede lo mismo con las WJC, ya que existe una gran variedad de opciones relativas a la metodología de aislamiento de estas células, entre las que destacan técnicas basadas en el método del explanto y técnicas de digestión enzimática, utilizando una o varias enzimas proteolíticas. Nosotros hemos llevado a cabo el aislamiento de WJC mediante un protocolo basado en la digestión enzimática del tejido; si bien algunos autores afirman que estos procesos van acompañados de una menor cantidad de células con menor tasa de viabilidad en comparación con el método del explanto (La Rocca y cols., 2009b; Xu Y y cols., 2010), la tasa de éxito que hemos logrado en el aislamiento de esta población celular es superior al 90%, y las células aisladas han demostrado tener niveles de viabilidad adecuados. Estos resultados son muy significativos, teniendo en cuenta que el número muestral supera los 150 cordones umbilicales procesados, y van en consonancia con otros grupos, como el del Lu y colaboradores, que obtuvieron una tasa de éxito del 100% en el aislamiento de WJC, utilizando un protocolo basado en una doble digestión enzimática con colagenasa de tipo II y tripsina (Lu y cols., 2006).

Una variable que puede determinar la efectividad del protocolo de digestión enzimática es el tiempo de incubación seleccionado. Teniendo en cuenta la gran diversidad de protocolos presentes en la bibliografía, y dada nuestra experiencia con la doble digestión enzimática para obtener poblaciones celulares de otros tejidos (Bellón y

cols., 2003; Buján y cols., 2006b; Gómez-Gil y cols., 2009), hemos llevado a cabo una serie de pruebas previas a la realización de los experimentos incluidos en esta Memoria de Tesis Doctoral, cuyo fin ha sido el de optimizar el protocolo de aislamiento de las WJC. Comenzamos incubando el tejido con colagenasa de tipo I al 0,1% durante 1 h, seguido de 30 min de digestión con tripsina-EDTA 1X, manteniendo siempre una temperatura constante de 37 °C. De forma gradual, fuimos incrementando el tiempo de incubación de la colagenasa hasta alcanzar las 24 h, sin modificar la digestión con tripsina-EDTA. Las pruebas preliminares que llevamos a cabo con las células obtenidas de las distintas incubaciones demostraron que el tiempo de incubación óptimo para aplicar en nuestro protocolo de aislamiento se encuentra entre las 4 y las 6 h de digestión con colagenasa de tipo I al 0,1%, junto con 30 min de digestión enzimática con tripsina-EDTA 1X.

5.1.2 Caracterización fenotípica de HUVEC

Las células endoteliales vasculares constituyen el tipo celular más numeroso del organismo. En combinación con la lámina subendotelial, forma el endotelio vascular, una capa continua que tapiza la superficie luminal de todos los vasos sanguíneos (De Angelis y cols., 1996). El endotelio vascular lleva a cabo numerosas funciones: regula la trombosis, la trombolisis y la adhesión plaquetar, modula el tono vascular y el flujo sanguíneo, y también controla las interacciones de monocitos y linfocitos con la pared vascular, regulando así las respuestas inmune e inflamatoria (Sumpio y cols., 2002). Debido a su ubicación estratégica, el endotelio es responsable de controlar el intercambio y la difusión pasiva de elementos moleculares y celulares entre la sangre circulante y el resto de tejidos del organismo (Jaffe, 1987; Scham y cols., 2012).

Las HUVEC que hemos aislado de la vena umbilical mediante digestión enzimática se expanden en cultivo formando una monocapa continua y homogénea sobre la superficie del frasco, emulando la capa que de forma natural forman sobre la lámina subendotelial en los vasos sanguíneos. Al analizar estas células mediante técnicas

de inmunofluorescencia, comprobamos que aproximadamente el 70% de la población celular presenta expresión positiva para CD31, CD34 y vWF. Estas observaciones inmunocitoquímicas van en consonancia descrito en la literatura (Müller y cols., 2002), y se ven reforzadas con los resultados obtenidos con el análisis de la expresión génica a nivel del mRNA, análisis mediante el cual hemos podido comprobar que los genes codificantes para estas tres proteínas están fuertemente expresados en los cultivos de HUVEC.

Hemos observado que estas células presentan niveles de expresión prácticamente nulos para el VEGF, confirmando que las células endoteliales no son productoras de este factor de crecimiento, sino que interactúan con él a través de los receptores (Loureiro y D'Amore, 2005). Nuestras células en cultivo han mostrado unos niveles de expresión de KDR entre 7 y 8 veces mayores que los observados para Flt-1. Esta diferencia en la expresión génica se ve reflejada en los estudios inmunocitoquímicos, donde observamos que más de la mitad de la población de HUVEC es positiva para KDR, mientras que apenas el 30% lo es para Flt-1. Estos resultados podrían indicarnos que el mecanismo de señalización celular a través del cual VEGF interactúa con las HUVEC en cultivo se lleva a cabo principalmente a través del receptor KDR, tal y como sugieren algunos autores (Holmes y cols., 2007).

5.1.3 Caracterización fenotípica de WJC

La población de WJC que hemos aislado de la gelatina de Wharton presenta dos fenotipos diferentes: la mayoría de las células del cultivo primario tienen una morfología elongada, mientras que un pequeño porcentaje de la población tiene un aspecto más estrellado. Con el avance de los subcultivos, las células sufren un aumento de volumen, y el porcentaje de células estrelladas incrementa ligeramente. Estas observaciones coinciden con las descritas por los grupos de Parry y Takechi, ya que ambos describieron la presencia de células elongadas y estrelladas inmersas en la gelatina de Wharton (Parry, 1970; Takechi y cols., 1993). Al igual que nosotros, estos autores

describieron la ultraestructura de estas células, observando que las WJC presentan un núcleo de gran tamaño con nucleolos prominentes, abundancia de vesículas de secreción y mitocondrias, y retículo endoplasmático muy desarrollado con cisternas dilatadas, entre otras características.

Las WJC poseen un citoesqueleto característico de célula adherente, con presencia de abundantes filamentos de α -tubulina y vimentina. En su citoplasma encontramos también filamentos de α -actina de músculo liso, y aproximadamente el 25% de la población celular contiene filamentos intermedios de desmina. Coincidimos por tanto con Takechi y colaboradores y Nanaev y colaboradores (Takechi y cols., 1993; Nanaev y cols., 1997), y consideramos que las WJC podrían constituir una población celular de fenotipo fibroblastoide en la que conviven características tanto de célula muscular lisa como de fibroblasto. Esta población se ha clasificado como una población mesenquimal, con características similares a las de las células mesenquimales de médula ósea adulta (Baksh y cols., 2007; Najar y cols., 2010a). Este tipo de células presentan la particularidad de expresar una serie de factores de transcripción implicados en el mantenimiento del potencial de diferenciación y de la capacidad de autorrenovación. En este sentido, tres de los factores de transcripción más estudiados son Nanog, Oct-4 y SOX2 (Rodda y cols., 2005).

Cuando se habla de la expresión de estos factores de transcripción en las poblaciones de WJC, la controversia está garantizada: algunos autores hacen referencia únicamente a la expresión de Oct-4, afirmando que está muy expresado en los cultivos de WJC (Hoynowski y cols., 2007; Jomura y cols., 2007; Huang P y cols., 2010; Nekanti y cols., 2010a-c; Corradetti y cols., 2011). Otros sugieren que, junto con Oct-4, la expresión de Nanog está también muy patente en esta estirpe celular (La Rocca y cols., 2009b; Anzalone y cols., 2010; Kita y cols., 2010; Montanucci y cols., 2011). Algunos, sin embargo, consideran que las WJC tienen una leve expresión de Nanog, Oct-4 y SOX2, con niveles inferiores a los observados en cultivos de células de origen

embrionario (Carlin y cols., 2006; Weiss y cols., 2006; Can y Karahuseyinoglu, 2007; Fong y cols., 2007; Sarugaser y cols., 2009; Schneider y cols., 2010a; Fong y cols., 2011; Taghizadeh y cols., 2011; Wang L y cols., 2011). Finalmente, son pocos los autores que afirman que las WJC en cultivo no presentan expresión alguna para ninguno de estos tres factores de transcripción (Ganta y cols., 2009; Ho y cols., 2010). En nuestro caso, los resultados que hemos obtenido con los análisis de expresión génica muestran que las WJC tienen expresión positiva para Nanog y Oct-4 entre el cultivo primario y el quinto subcultivo, mientras que la expresión de SOX2 se mantiene en unos niveles basales durante todos los subcultivos analizados. Observamos una cierta tendencia por parte de las células a disminuir la expresión de estos factores con el avance de los subcultivos, hecho que concuerda con las observaciones de Fong y colaboradores, que detectaron mediante técnicas de microarrays de RNA y qRT-PCR una disminución en la expresión de Nanog y Oct-4 a lo largo del tiempo (Fong y cols., 2011). De estos tres factores de crecimiento, Oct-4 parece ser más relevante para el mantenimiento de la capacidad multipotente de las células mesenquimales (Alison y cols., 2006). Por este motivo hemos validado su expresión mediante técnicas de inmunofluorescencia, comprobando que más del 80% de la población de WJC es positiva para este marcador, al menos durante los primeros cinco subcultivos.

Existen una serie de proteínas que, si bien no están exclusivamente relacionadas con las células madre, se emplean con frecuencia como marcadores de célula de tipo mesenquimal. Las proteínas CD9, E-cadherina y PODXL constituyen un ejemplo de estos marcadores. La CD9 es una glicoproteína de superficie que interviene en numerosos procesos celulares entre los que destacan la transducción de señales, así como su implicación en la diferenciación y la adhesión celular (Horejsí y Vlcek, 1991). La proteína de membrana E-cadherina juega un papel muy importante en los procesos de adhesión celular, asegurando la continuidad en los tejidos, así como en el control de la proliferación celular que podría provocar el desarrollo de tumores (Semb y Christofori, 1998). PODXL está implicada tanto en el control de la adhesión como en el de la morfología y la proliferación celular. Es una proteína anti-adhesiva cuya función

consiste en mantener un patrón de filtración entre las células vecinas, al mismo tiempo que actúa como molécula pro-adhesiva, facilitando la adherencia de las células a sus ligandos (Kershaw y cols., 1997). Al evaluar la presencia de estos marcadores en las WJC mediante técnicas de inmunofluorescencia, hemos comprobado que, tras cinco subcultivos, estas células expresan niveles muy bajos de CD9, mientras que aproximadamente la mitad de la población es positiva para PODXL y más del 80% lo es para E-cadherina. Recientemente, se ha publicado una revisión (Jeschke y cols., 2011) en la que cuestionan la capacidad de las WJC para expresar E-cadherina, argumentando que este tipo celular produce niveles muy bajos de E-cadherina debido a sus características fibroblastoides (Nose y cols., 1988). Sin embargo, nosotros no estamos de acuerdo con esta afirmación, ya que hemos podido comprobar la presencia de este marcador en reiteradas ocasiones, obteniendo siempre un elevado porcentaje de expresión (Alaminos y cols., 2010).

En resumen, hemos observado que durante el tiempo de estudio establecido, estas células presentan expresión de los factores de transcripción Nanog y Oct-4, además de tener un patente marcaje positivo para E-cadherina. Juntos, estos resultados sugieren que durante las primeras etapas en cultivo, las WJC mantienen un cierto grado de potencial de diferenciación multipotente, y de capacidad autorrenovadora.

5.1.4 Modificaciones fenotípicas de WJC (Dif-WJC)

El proceso de diferenciación que hemos llevado a cabo sobre las células de la gelatina de Wharton (WJC) tiene su base en el cultivo de estas células utilizando un medio enriquecido con factor de crecimiento endotelial.

Durante este proceso de diferenciación, hemos observado notables variaciones fenotípicas en la estirpe WJC. A esta nueva población celular la hemos denominado Dif-WJC, en comparación con su predecesora indiferenciada, WJC. Una de las respuestas más tempranas que presentan estas células al inicio de la diferenciación es el

incremento del volumen citoplasmático, que va acompañado de un cambio hacia una morfología más estrellada.

Al igual que las células indiferenciadas, las Dif-WJC presentan un citoesqueleto formado por filamentos de α -tubulina, vimentina y α -actina de músculo liso. Curiosamente, observamos un incremento significativo en la expresión de filamentos de desmina. Estos filamentos están muy relacionados con la citoarquitectura de los mioblastos, incrementando su presencia a medida que éstos se diferencian hacia células musculares lisas (Bär y cols., 2004; Paulin, 2004). El hecho de que la presencia de filamentos de desmina se vea incrementada en estas células podría significar que las Dif-WJC están modulando sus características de célula mioblastoide, a pesar de estar sometidas a un estímulo exógeno de diferenciación endotelial.

Cuando analizamos la expresión génica de los tres factores de transcripción seleccionados comprobamos que, tanto Nanog como Oct-4, disminuyen gradualmente sus niveles de expresión a lo largo de los primeros cinco subcultivos. En el caso de SOX2, la expresión disminuye hasta alcanzar niveles indetectables, considerando por tanto que en el quinto subcultivo estas células han dejado de expresar SOX2. Estos resultados van en consonancia con la idea de que Nanog y Oct-4 actúan conjuntamente en el mantenimiento de la multipotencialidad celular (Loh y cols., 2006). Al comparar las Dif-WJC con las WJC, comprobamos que no existen diferencias estadísticamente relevantes en la expresión de Nanog y Oct-4, pudiendo por tanto sugerir que durante los primeros cinco subcultivos, y a pesar del estímulo de diferenciación endotelial, las células de la estirpe Dif-WJC no están perdiendo sus propiedades de multipotencialidad gracias a la expresión combinada de estos dos factores de transcripción. En el caso concreto de Oct-4, este planteamiento se ve reforzado gracias a la inmunofluorescencia, ya que, al igual que sucedía con las WJC, más del 80% de la población celular se mantiene positiva para este marcador en el quinto subcultivo.

Hemos podido observar también una disminución en la expresión de los marcadores CD9, E-cadherina y PODXL, siendo especialmente relevante la reducción de CD9. Recientemente se ha publicado que la proteína CD9 se puede utilizar como un marcador de células autorrenovadoras y con capacidad de supervivencia a largo plazo en presencia de un ambiente xenogénico (Zohni y cols 2012). La significativa disminución en la expresión de este marcador podría suponer que la exposición al estímulo de diferenciación endotelial está provocando en las Dif-WJC una pérdida en la capacidad autorrenovadora, aunque sigan manteniendo un cierto grado de multipotencialidad.

5.1.5 Inmunofenotipo de WJC y Dif-WJC

Con independencia de su localización anatómica en el tejido (subamniótica, peri o intervacular), las células de la gelatina de Wharton se han caracterizado como una estirpe celular primitiva que cumple los requisitos de la *Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)*, ya que son células de crecimiento adherente, con morfología y fenotipo mesenquimal, y potencial de diferenciación *in vitro*, así como una evidente capacidad de autorrenovación en cultivo (Arufe y cols., 2011).

El inmunofenotipo de las WJC se ha estudiado exhaustivamente mediante análisis por citometría de flujo. La mayoría de los autores coinciden en que esta población celular cumple los requisitos mínimos de la *ISCT* en cuanto a expresión de determinados marcadores clave (Anzalone y cols., 2010). Para realizar el presente trabajo, nosotros hemos seleccionado cuatro de estos marcadores: CD105, CD146, CD90 y CD45.

Se ha postulado que la proteína CD31 (también llamada endoglina), que forma parte del complejo del receptor TGF- β (Nassiri y cols., 2011), podría estar implicada en el desarrollo del sistema cardiovascular así como en procesos de remodelación vascular (Sanz-Rodríguez y cols., 2004). Son varios los autores que demuestran que las células de

la gelatina de Wharton tienen expresión positiva para CD105 (Wang HS y cols., 2004; Conconi y cols., 2006; Troyer y Weiss, 2007; La Rocca y cols., 2009b; Wu KH y cols., 2009; Anzalone y cols., 2010). Nuestros resultados coinciden con estas descripciones, ya que hemos comprobado que tanto WJC como Dif-WJC expresan CD105. Sin embargo, la expresión de esta proteína no se mantiene a lo largo del tiempo, de manera que las células se tornan negativas para CD105 en el quinto subcultivo.

Las células de la gelatina de Wharton se han caracterizado como una población positiva para CD146 (Baksh y cols., 2007; Schugar y cols., 2009), una molécula de adhesión celular presente en la membrana citoplasmática de linfocitos T activados, células mesenquimales, endoteliales y musculares lisas, entre otras (Covas y cols., 2008), y que parece estar relacionada con la propiedad de multipotencialidad, de modo que su expresión es más intensa en aquellas células que presentan un mayor potencial de diferenciación (Russell y cols., 2010). En este sentido, nosotros estamos de acuerdo con lo descrito en la bibliografía durante los primeros estadios de cultivo. Sin embargo, al ir aumentando número de subcultivos, observamos unos resultados similares a los descritos para CD105: en el primer subcultivo, ambas estirpes contienen un porcentaje de la población con expresión positiva para este marcador. Sin embargo, entre el tercer y el quinto subcultivo observamos una pérdida en la capacidad de expresión de CD146 tanto en WJC como en Dif-WJC.

Las discrepancias que encontramos en cuanto a la expresión de CD105 y CD146 con respecto a otros autores podrían ser debidas al hecho de que, en nuestro caso, evaluamos la expresión de estos marcadores de forma secuencial a lo largo de los diferentes subcultivos, mientras que los demás grupos suelen llevar a cabo este análisis evaluando las células procedentes de un subcultivo determinado.

Al analizar la expresión de CD90 (Thy-1) en cultivos de WJC y Dif-WJC, observamos que nuestros resultados concuerdan con lo descrito en la literatura, ya que prácticamente el 100% de la población celular indiferenciada WJC es muy positiva para

este marcador entre el cultivo primario y el quinto subcultivo. Cabe destacar que CD90 es una proteína de superficie muy conservada que se expresa en gran número de estirpes celulares tales como fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, células madre de la línea hematopoyética y células mesenquimales (Kisselbach y cols., 2009). Esta proteína participa en los procesos de inflamación y cicatrización que conllevan la síntesis y liberación de factores de crecimiento, citoquinas y componentes de la matriz extracelular que intervienen en los procesos de cicatrización y reparación del tejido dañado (Kisselbach y cols., 2009), y está relacionada con el crecimiento y diferenciación de las células madre (Rege y Hagoood, 2006). Varios autores han demostrado, al igual que nosotros, que las WJC tienen una fuerte expresión para este marcador (Troyer y Weiss, 2007; La Rocca y cols., 2009b; Wu KH y cols., 2009; Anzalone y cols., 2010). En el caso de las células diferenciadas Dif-WJC, comprobamos que la población se comporta de manera muy similar a lo anteriormente descrito, aunque en el quinto subcultivo el porcentaje de células positivas para CD90 es ligeramente inferior.

En cuanto al fenotipo hematopoyético de estas células (WJC y Dif-WJC), los estudios de CD45, proteína transmembrana que se expresa en todas las células de la línea hematopoyética excepto en eritrocitos y células plasmáticas (Altin y Sloan, 1997), demuestran que WJC y Dif-WJC no presentan este tipo de marcadores, lo cual concuerda con lo descrito por varios autores, que hacen referencia a que las células mesenquimales de la gelatina de Wharton no pertenecen a una línea hematopoyética (Wang HS y cols., 2004; Weiss y cols., 2006; La Rocca y cols., 2009b; Wu KH y cols., 2009; Anzalone y cols., 2010)

En conjunto, todos estos resultados demuestran que, en primer lugar, las WJC no son de origen hematopoyético, ya que no expresan la proteína de superficie CD45 característica de las líneas linfocitarias. Aunque nuestros resultados difieren de los publicados por el grupo de Lupu, que observaron una elevada expresión de CD105 y CD146 en estas células (Lupu y cols., 2011), bajo nuestras condiciones experimentales, estas células presentan un leve inmunofenotipo mesenquimal, debido a que los niveles

de expresión para CD105 y CD146 no alcanzan el 95% de positividad que exige la *Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)*. Este inmunofenotipo mesenquimal se pierde de forma gradual con su mantenimiento en cultivo, especialmente cuando las células se someten a un proceso de diferenciación hacia la estirpe endotelial.

5.1.6 Crecimiento, proliferación y viabilidad de WJC y Dif-WJC

Las células de la gelatina de Wharton han sido sometidas a múltiples análisis con el fin de determinar su viabilidad y capacidad proliferativa en cultivo. Algunos autores sostienen que estas células son muy proliferativas, con una vida media que supera los sesenta pases en cultivo ([Medicetty y cols., 2004](#); [Mitchell y cols., 2003](#)). Estos autores llevan a cabo sus experimentos utilizando células de origen porcino; consideramos que las células animales pueden tener patrones de comportamiento en cultivo diferentes a las humanas, ya que los resultados obtenidos por quienes trabajamos con células de origen humano varían sustancialmente, no sólo desde un punto de vista interespecífico, sino también intraespecífico: aunque algunos grupos afirman que estas células pueden alcanzar entre 15 y 40 pases en cultivo ([Conconi y cols., 2006](#); [Lu y cols., 2006](#); [Lund y cols., 2007](#); [Qiao y cols., 2007](#); [Bakshi y cols., 2008](#); [Chao y cols., 2008](#)), otros, entre los cuales nos encontramos, sostenemos que las WJC humanas presentan signos de senescencia entre el séptimo y noveno subcultivo ([Wang HS y cols., 2004](#); [Ma y cols., 2005](#); [Capelli y cols., 2011](#); [Wang HW y cols., 2011](#)). Los resultados obtenidos en colaboración con el grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada ([Garzón y cols., 2012](#)) muestra una disminución en la viabilidad de las WJC a partir del séptimo subcultivo.

Los resultados plasmados en la presente Memoria de Tesis Doctoral indican que ambas estirpes WJC y Dif-WJC tienen niveles de viabilidad semejantes en los diferentes subcultivos evaluados. Esto demuestra, en primer lugar, que el proceso de diferenciación celular no afecta a la viabilidad de las Dif-WJC y que, además, el menor crecimiento de la población diferenciada en comparación con WJC no se debe a una

disminución en la viabilidad celular. A pesar de esto, la capacidad proliferativa de las dos poblaciones celulares es muy diferente, ya que observamos una mayor proliferación en los cultivos de WJC en comparación con Dif-WJC, algo que va en consonancia con las observaciones descritas por Xu y colaboradores, quienes afirmaron que, al inicio de la diferenciación endotelial, las células de la gelatina de Wharton experimentan una disminución de su capacidad proliferativa, que se traduce en un incremento del tiempo de duplicación de esta estirpe celular (Xu Y y cols., 2010). Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos afirmar que las Dif-WJC presentan una curva de crecimiento cuya tendencia se aproxima más a la de una estirpe celular diferenciada -como podrían ser las HUVEC-, que a una población indiferenciada -como las WJC-. Estos resultados coinciden con los publicados por Lupu y colaboradores, que observaron una capacidad proliferativa dos veces superior en cultivos de WJC en comparación con las HUVEC (Lupu y cols., 2011).

5.1.7 Actividad telomerasa

La telomerasa es una enzima cuya actividad está estrechamente relacionada con el mantenimiento de la longitud de los telómeros tras cada división mitótica. Al evitar el acortamiento de los extremos cromosómicos, la telomerasa permite que las células mantengan su ciclo vital sin signos de senescencia replicativa, motivo por el cual la actividad de esta enzima ha sido también relacionada con procesos cancerígenos y con el establecimiento de líneas inmortalizadas (Kim NW y cols., 1994). En los cultivos celulares procedentes de tejidos sanos, las repeticiones teloméricas suelen perderse durante los sucesivos procesos replicativos, limitando la capacidad proliferativa de las células (Harley y cols., 1990; Allsopp y cols., 1995; Bodnar y cols., 1998; Martens y cols., 2000). Aunque la mayoría de las células maduras no tienen actividad telomerasa, ésta sí se ha observado en células madre de algunos tejidos adultos (Ninagawa y cols., 2011).

En el caso concreto de las células de la gelatina de Wharton, los datos publicados en relación a la longitud de los telómeros y a la actividad telomerasa de estas células son

controvertidos: si bien la mayoría de los autores sostiene que las WJC en cultivo presentan telómeros largos (Ferguson y Dobson, 2009; La Rocca y cols., 2009b; Angelucci y cols., 2010) gracias a una actividad telomerasa positiva (Mitchell y cols., 2003; Mitchell y cols., 2005; Karahuseyinoglu y cols., 2007; Lund y cols., 2007; Jo y cols., 2008; Kestendjieva y cols., 2008; Weiss y cols., 2008; Pappa, 2009; Filioli-Uranio y cols., 2011), otros cuestionan este hecho, al comprobar con sus experimentos que las WJC tienen escasa o nula actividad telomerasa (Gómez-Aristizábal y cols., 2006; Ennis y cols., 2008b; Ho y cols., 2010), favoreciendo así el acortamiento de los telómeros durante los sucesivos subcultivos, lo que provoca que las células entren en un estado de senescencia replicativa pasado un determinado número de divisiones (Moretti y cols., 2010). Nuestros resultados van en consonancia con estos últimos autores, ya que ninguno de los cultivos celulares que hemos analizado presenta actividad telomerasa detectable. Esto apoya la teoría de Zimmermann y colaboradores que, tras observar la actividad negativa de la telomerasa en diferentes poblaciones de células mesenquimales, postularon que este tipo de células podrían tener algún tipo de diferencias con respecto al resto de células madre, al menos en lo relacionado a la actividad de esta enzima (Zimmermann y cols., 2003).

5.1.8 Eficacia de la diferenciación endotelial

Las células de la gelatina de Wharton se han utilizado en modelos experimentales de diferenciación endotelial en limitadas ocasiones. Esto significa que hasta la fecha no se han recolectado suficientes datos -cuantitativos y cualitativos- como para poder afirmar categóricamente la capacidad de esta población celular para dirigirse hacia la estirpe endotelial.

Dentro de nuestro primer objetivo, hemos evaluado el potencial de diferenciación endotelial de las WJC bajo condiciones experimentales *in vitro*, obteniendo un elevado número de resultados que podemos clasificar en dos categorías: fenotipo y función.

Entre las características fenotípicas, destacamos la tendencia de las Dif-WJC a adquirir una morfología estrellada-poligonal, pudiendo afirmar que el estímulo de diferenciación al que están sometidas estas células influye de algún modo en el fenotipo, haciendo que éstas pierdan su aspecto fusiforme para gradualmente adquirir una morfología más semejante a la de las células endoteliales. Estos resultados coinciden con los previamente descritos por GITBIT-UAH en colaboración con la Universidad de Granada (Alaminos y cols., 2010), así como por el grupo de Wang, que observaron en las WJC un cambio morfológico hacia el fenotipo endotelial tras un periodo de cultivo 14 días en un medio específico de diferenciación (Wang SH y cols., 2009).

Las características funcionales de las Dif-WJC son las que van a determinar su efectividad como posible sustituto de las células endoteliales. Debido a que estas células juegan un papel crucial para el correcto funcionamiento del endotelio vascular, resulta imprescindible que las células diferenciadas hacia esta estirpe tengan la capacidad de emular dichas funciones. Las células endoteliales producen y secretan un elevado número de sustancias que participan activamente en el desarrollo y mantenimiento de las funciones normales del endotelio. Una de estas sustancias es la prostaciclina, un prostanoide con actividad vasodilatadora y antiagregante fundamental para el mantenimiento de la homeostasis vascular (Rosenkranz y cols., 1980). Para poder estudiar la actividad de la prostaciclina en los diferentes cultivos celulares es necesario recurrir a uno de sus intermediarios metabólicos, 6-keto-prostaglandina- $F_{1\alpha}$, ya que ésta no es muy estable en cultivo. Los resultados que hemos obtenido al evaluar por ELISA la actividad de este metabolito contrastan notablemente entre los diferentes grupos de estudio, debido a que las HUVEC secretan al medio de cultivo entre 12 y 15 veces más 6-keto-prostaglandina- $F_{1\alpha}$ que las estirpes WJC y Dif-WJC. Las HUVEC tienen además una tendencia a disminuir la liberación de este metabolito a medida que avanzan los subcultivos, hecho que concuerda con lo que en el año 2008 demostramos mediante técnicas analíticas de radioinmunoensayo (Rodríguez-Morata y cols., 2008). Reiteramos ahora lo que postulamos entonces, y reafirmamos que el momento de mayor

funcionalidad para las células endoteliales humanas en cultivo se encuentra entre el primer y el segundo subcultivo.

La incapacidad de los cultivos de Dif-WJC para secretar este metabolito de la prostaciclina viene acompañada de otros fenómenos importantes que comprometen la funcionalidad de estas células como célula endotelial “artificial”: los resultados obtenidos mediante el análisis de la expresión génica y las técnicas de inmunofluorescencia demuestran que las Dif-WJC no tienen expresión de CD31, CD34 ni vWF a nivel de mRNA.

Al inicio de nuestro estudio, llevamos a cabo análisis genéticos mediante técnicas de microarrays de RNA y qRT-PCR (Alaminos y cols., 2010). En el momento inicial de la diferenciación de estas células, obtuvimos resultados prometedores al comprobar que la expresión de algunos genes parecía aumentar levemente tras la inducción, (CD31, CD34, vWF y Flt-1), aunque los estudios realizados mediante inmunocitoquímica no lograron corroborar los resultados previos. Esto podría ser debido a la existencia de una disregulación en los procesos de transcripción y/o traducción de estos genes.

Otra función importante de las células endoteliales está regulada por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Esta enzima, producida por las propias células del endotelio, está implicada en procesos de regulación del tono vascular mediante la inhibición de la agregación plaquetar y de la contracción de células musculares lisas de la túnica íntima (Marsden y cols., 1992). Comprobamos que las HUVEC expresan cantidades muy elevadas de esta enzima, mientras que WJC y Dif-WJC tienen valores de expresión por debajo del umbral de detección.

Al estudiar la expresión génica del VEGF y sus receptores, hemos comprobado que, tanto la población WJC como la Dif-WJC, tienen la capacidad de expresar este factor de crecimiento en niveles similares durante todos los subcultivos analizados; esto significa que las células de la gelatina de Wharton, a diferencia de las endoteliales, son

productoras de VEGF, y que el estímulo de diferenciación endotelial no provoca en estas células un cese en la producción de este factor de crecimiento. En cuanto a los receptores, observamos que la expresión del receptor Flt-1 es considerablemente mayor que la de KDR. Estos resultados coinciden con los descritos por Lupu y colaboradores, que observaron en las células de la gelatina de Wharton la presencia de estos receptores tras ser cultivadas en un medio de diferenciación endotelial (Lupu y cols., 2011), aunque contrasta con los resultados publicados por los grupos de Chen y Wang, que observaron principalmente la expresión del receptor KDR en las células diferenciadas hacia la línea endotelial (Chen y cols., 2009; Wang SH y cols., 2009). Teniendo en cuenta que nuestro medio de cultivo carece de VEGF en su composición y que la expresión génica de las células de la gelatina de Wharton para este factor no disminuye de forma significativa entre el primer y el quinto subcultivo, consideramos que el mecanismo de señalización celular empleado por estas células podría llevarse a cabo mediante una retroalimentación positiva de las células, mediada principalmente por el receptor Flt-1.

En líneas generales, el comportamiento de nuestras Dif-WJC sometidas a diferenciación endotelial *in vitro* contrasta con lo publicado por otros grupos: Wu y colaboradores afirman que entre un 30 y un 50% de su población celular se torna positiva para CD31 y CD34 tras la diferenciación (Wu KH y cols., 2007); junto con ellos, el grupo de Wang documenta una intensa diferenciación endotelial de sus células (Wang SH y cols., 2009), al observar por técnicas de inmunofluorescencia y Western Blot expresión positiva para CD31, CD34, vWF, KDR y trombomodulina. En ambos casos, el medio de cultivo empleado para la diferenciación endotelial está enriquecido con los factores de crecimiento VEGF y bFGF. Está demostrado que estos dos factores, cuando se emplean combinadamente, actúan de forma sinérgica estimulando la migración y reorganización celular, que a su vez favorece la aparición de estructuras tubulares en el cultivo, tanto en experimentos *in vitro* (Goto y cols., 1993), como *in vivo* (Polykandriotis y cols., 2011). Creemos por tanto que éste podría ser el motivo por el cual los grupos de Wu y Wang observaron que las células de la gelatina de Wharton

diferenciadas a la línea endotelial desarrollaban un patrón vascular en cultivos de matrigel (Wu KH y cols., 2009; Wang SH y cols., 2009). Recientemente se ha demostrado que este efecto ocurre también cuando las células se cultivan únicamente en presencia de VEGF (Olivieiro y cols., 2012), lo que explicaría el motivo por el que Chen y colaboradores lograron que sus células diferenciadas formasen estructuras tubulares sobre matrigel, a pesar de no figurar bFGF entre los componentes de su medio de diferenciación endotelial (Chen MY y cols., 2009).

El uso de VEGF como estímulo de diferenciación endotelial en los cultivos de WJC podría tener efectos negativos, ya que existe la posibilidad de que este factor de crecimiento interfiera con los patrones de señalización celular innatos que regulan las señales paracrinas de esta estirpe celular, tal y como han sugerido Lupu y colaboradores recientemente (Lupu y cols., 2011). Por este motivo, eliminando el VEGF del medio de cultivo, podríamos obtener unos resultados más aproximados del potencial de diferenciación real que poseen las células de la gelatina de Wharton.

Los resultados publicados por el grupo de Lupu son controvertidos en comparación con los mencionados anteriormente. Tras extraer las células de la gelatina de Wharton, cultivarlas con un medio de diferenciación endotelial carente de VEGF, y sembrarlas sobre secciones ventriculares de embriones de ratón, comprobaron que las células no experimentaban una diferenciación endotelial completa, ya que éstas no expresaban determinados marcadores clave como VE-cadherina o vWF. Del mismo modo, las células diferenciadas no perdían la expresión de ciertos marcadores mesenquimales como CD73, CD90, CD105 o CD146. Estos resultados les llevaron a sugerir que las células de la gelatina de Wharton, en presencia de un estímulo de diferenciación endotelial, muestran algunas características de célula endotelial, sin perder las características de célula mesenquimal. Nosotros estamos, en cierto modo, de acuerdo con esta afirmación, ya que nuestros resultados demuestran que las Dif-WJC mantienen ciertas características de célula mesenquimal tras 5 subcultivos en medio de diferenciación endotelial. Sin embargo, dado el estatus de célula fibroblastoide de esta

estirpe, consideramos que, junto con las características de célula mesenquimal, las células de la gelatina de Wharton en cultivo ven aumentadas algunas de sus propiedades musculares, como por ejemplo la expresión de desmina y α -actina de músculo liso que hemos observado mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Otra de las consideraciones a tener en cuenta en la valoración de los resultados es el medio de cultivo utilizado. En nuestro caso, el medio seleccionado para aislar y mantener en cultivo la población de WJC ha sido AmnioMAX™-C100, debido principalmente a la gran experiencia que tenemos en relación con el uso de este medio (Hernando y cols., 1994; Bellón y cols., 1997; Bellón y cols., 2001; Gimeno y cols., 2001; Bellón y cols., 2003; Buján y cols., 2004; Buján y cols., 2005; Bellón y cols., 2006; Buján y cols., 2006b; Pascual y cols., 2007; Gómez-Gil y cols., 2009; Alaminos y cols., 2010; Garzón y cols., 2012). En nuestro modelo experimental, hemos podido observar que las WJC están comprometidas hacia una línea mesenquimal fibroblastoide (conjuntiva) desde sus primeras etapas en cultivo. Esto podría ser debido a que el medio de cultivo AmnioMAX™-C100 actúe sobre el cultivo, condicionando de modo irreversible a estas células, e impidiendo por tanto una diferenciación endotelial plenamente funcional.

En resumen, los resultados que hemos obtenido mediante esta serie de análisis *in vitro* nos han permitido clasificar a las células de la gelatina de Wharton como una estirpe celular muy particular, con características comunes entre célula mesenquimal y célula fibroblástica. A pesar de que los estímulos exógenos de diferenciación endotelial empleados tienen efecto sobre estas células, no son suficientes para provocar su total diferenciación hacia la estirpe endotelial, lo que nos conduce hacia nuestro segundo objetivo: validar la capacidad de diferenciación de estas células en un modelo experimental *in vivo*, en el supuesto de que los factores moleculares y mecánicos presentes en la sangre puedan influir directamente sobre el cambio fenotípico de estas células mesenquimales.

5.2 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

5.2.1 Selección del modelo experimental

Para la realización de nuestro modelo experimental *in vivo*, hemos prestado especial atención a la elección de tres factores muy importantes -animal de experimentación, biomaterial y tiempo de estudio-, que nos han permitido alcanzar el segundo de nuestros objetivos: comprobar la eficacia de las células de la gelatina de Wharton en aplicaciones de Ingeniería Tisular Vasular.

Es muy importante que los modelos experimentales diseñados mediante técnicas de Ingeniería Tisular Vasular se aproximen lo máximo posible al ser humano, tanto en dimensiones físicas como fisiológicas. Para lograr esto, hay que tener en cuenta el hecho de que el ser humano se encuentra en una posición de bipedestación, a diferencia de la mayoría de los animales empleados en los diferentes modelos experimentales, que son típicamente cuadrúpedos. Este hecho hace que las fuerzas debidas a la gravedad y las fuerzas de cizallamiento (*shear stress*) influyan de forma diferente en la estructura y función del sistema vascular en los distintos modelos. En base a todo ello, se torna fundamental la elección de un modelo animal que, tanto a nivel anatómico como fisiológico, disponga de un territorio vascular semejante al presente en el ser humano, a sabiendas de que la influencia que las fuerzas anteriormente mencionadas serán un factor determinante (Sánchez Crespo y cols., 2010).

Aunque en los últimos años se está comenzando a trabajar con la oveja como animal de experimentación (Teebken y Haverich, 2002), el perro es considerado como uno de los animales más adecuados para su uso, no sólo en investigación básica, sino también en estudios preclínicos, al tratarse de una especie animal muy utilizada en la evaluación de gran variedad de tratamientos farmacológicos por su similitud, en muchos casos, con la anatomía y fisiología humana (Filioli-Uranio y cols., 2011). En este sentido, en el caso de la Ingeniería Tisular Vasular, el perro constituye un buen

modelo experimental, gracias al calibre de su sistema cardiovascular y a las funciones fisiológicas semejantes a las humanas (Travis y cols., 2009). Por este motivo, y dada nuestra experiencia previa en el campo de la sustitución arterial en este animal (García-Honduvilla y cols., 2008), hemos seleccionado el perro como nuestro modelo experimental.

Otro de los parámetros a tener en cuenta en nuestro modelo experimental, y que se corresponde fielmente con uno de los pilares básicos de la Ingeniería Tisular, es la utilización de un soporte (*scaffold*) adecuado que nos permita su integración como sustituto vascular. Para la elección de este soporte nos basamos en la utilización de los biomateriales más adecuados en la sustitución arterial. Hay que destacar que estos biomateriales van a estar en contacto directo con uno de los tejidos más complejos del organismo humano, la sangre. La complejidad de este tejido influye directamente sobre la dificultad de encontrar un biomaterial capaz de responder de forma adecuada, no sólo frente a los componentes anatómicos y fisiológicos de la sangre, sino también a los componentes mecánicos provocados por la acción del flujo sanguíneo (Tosun y cols., 2011).

En la actualidad, la composición de los distintos biomateriales que se utilizan en Ingeniería Tisular Vascular varía sustancialmente entre unos y otros. El diseño de los primeros sustitutos vasculares de vinion-N durante los años 50 (Voorhees y cols., 1952) abrió las puertas a toda una industria que hoy en día nos brinda la posibilidad de trabajar con distintos tipo de biomateriales. Los biomateriales, con independencia de su aplicación, se pueden subdividir en dos grandes grupos: naturales o sintéticos.

Parece obvio señalar que el mejor sustituto para un territorio arterial dañado es un vaso de tipo autólogo, procedente del propio paciente (autoinjerto). El problema reside en que, en primer lugar, no se puede utilizar un territorio arterial para sustituir otro de la misma naturaleza -salvo en casos excepcionales, como en el uso de la arteria mamaria interna para la realización de *bypass* aortocoronario (Gossner y Larsen, 2009)-. Además,

otro de los problemas reside en la dificultad que encuentran los cirujanos vasculares para disponer de territorios vasculares apropiados, generalmente venosos, para realizar la sustitución arterial.

Clásicamente, esta problemática ha conllevado al estudio y desarrollo de diferentes estrategias que nos permitan obtener un buen sustituto arterial. El campo de los biomateriales naturales se centra en el uso de tejidos, vasos o válvulas decelularizadas (Quint y cols., 2012) como sustitutos vasculares ideales. Esta idea resulta muy atractiva, ya que su uso en clínica reduciría al mínimo el riesgo de rechazo inmunológico tras recibir un injerto -incluso cuando éste es de tipo alogénico o xenogénico-, al mismo tiempo que se utiliza un material biológico con las propiedades mecánicas innatas del tejido nativo (Konuma y cols., 2009). Sin embargo, aunque se han documentado varios resultados prometedores en cuanto al uso de este tipo de injertos (Martín ND y cols., 2005), también se han observado complicaciones relativas al control de la velocidad de degradación de los mismos (Walles y cols., 2003), que podría estar incentivada por el deterioro del tejido tras los agresivos procesos de decelularización (Simon y cols., 2003), lo que supone un problema que por el momento no parece tener fácil solución.

Como alternativa a la utilización de los biomateriales naturales, que como hemos descrito no siempre son eficaces, han proliferado las investigaciones encaminadas a la obtención de biomateriales sintéticos que cumplan la función de verdaderos sustitutos arteriales. Este tipo de biomateriales puede fabricarse con materiales inertes de tipo no degradable o biodegradable. Los biomateriales no degradables más populares en Ingeniería Tisular Vascul ar son los de Dacron® y ePTFE, y constituyen en la actualidad las prótesis vasculares más utilizadas en clínica humana (Roll y cols., 2008; Chlupác y cols., 2010). Por su parte, los biomateriales biodegradables son muy diversos y se utilizan principalmente con fines de investigación básica; algunos de los más comunes se componen de ácido poliláctico (Zhu A y cols., 2009), ácido poliglicólico (Fujiwara y cols., 2010), poliuretano (Xu W y cols., 2010) o policaprolactona (De Valence y cols., 2012), entre otros.

En nuestro modelo experimental hemos seleccionado biomateriales de ePTFE como soporte para el diseño de los distintos equivalentes tisulares, ya que este biomaterial es de los más empleados en la clínica humana. Estudios previos demuestran que la porosidad del biomaterial influye en el desarrollo y estabilización de la hiperplasia intimal en el lumen del injerto, de manera que a mayor porosidad, mayor dificultad para estabilizar la capa luminal neoformada (Bellón y cols., 1993; Contreras y cols., 2000). A su vez, estas prótesis presentan un mayor riesgo de oclusión trombótica cuando tienen un calibre interno inferior a 6 mm (Hamilton, 2009). Teniendo en cuenta estos argumentos, y que nuestro objetivo no es otro que el de lograr mejorar la efectividad de prótesis de aplicación clínica, hemos seleccionado biomateriales de ePTFE con una distancia internodal de 30 μm y diámetro interno de 4 mm.

Finalmente, nos basamos en nuestra experiencia previa (García-Honduvilla y cols., 2008) para seleccionar el tiempo de estudio: consideramos que un periodo de 60 días es suficiente para permitir que se desencadenen los procesos reparativos en la pared arterial tras llevar a cabo los implantes, permitiéndonos valorar objetivamente la eficacia de cada uno de los equivalentes tisulares empleados una vez finalizado el tiempo de estudio.

5.2.2 Modificación de la superficie protésica

La superficie luminal de las prótesis vasculares de ePTFE, debido a sus características antiadherentes, proporciona a las células un entorno con carga muy electronegativa que no favorece su adhesión al biomaterial. Esto ha supuesto la necesidad de mejorar la superficie protésica, con el fin de facilitar el anclaje de las células al lumen protésico y formar así una capa celular lo más estable y homogénea posible.

En este sentido, se han validado diversas proteínas y moléculas de adhesión, con el fin de identificar el recubrimiento ideal para el lumen protésico, que permita a las

células adherirse firmemente y combatir así las fuerzas de cizallamiento provocadas por el flujo sanguíneo a su paso por el constructo (Xiao y Shi, 2004). Aunque en la actualidad se puede tener acceso a maquinaria específicamente diseñada para realizar la siembra celular de forma automatizada (Udelsman y cols., 2011), o mediante procesos electrostáticos (Pawlowski y cols., 2004), la siembra celular se ha llevado a cabo tradicionalmente de forma manual, y empleando sustancias adhesivas como colágeno (Noishiki y cols., 1996), fibrina (Sreerekha y Krishnan, 2006), fibronectina (Poole-Warren y cols., 1996), matrigel (Randone y cols., 2005) o gelatina (Prager y cols., 2001), señales destinadas a facilitar el anclaje de las células al biomaterial. Si bien se han encontrado diversas sustancias que favorecen la adhesión celular en el lumen protésico, aún no se ha logrado dar con el sustrato ideal (Pawlowski y cols., 2004; Monahan y LoGerfo, 2007). Los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que la fibronectina sigue siendo una buena molécula de adhesión que incrementa sustancialmente la eficacia de la siembra celular sobre el lumen de los biomateriales de ePTFE, como ya se describió en años precedentes (García-Honduvilla y cols., 1995).

Existen otras estrategias encaminadas a incrementar la estabilidad de la siembra celular sobre el lumen protésico: el diseño de matrices fibroblásticas que actúen a modo de membrana subendotelial facilita el anclaje de las células endoteliales. Este modelo ha sido validado con resultados prometedores, ya que las células endoteliales incrementan de forma notable su adhesión y resistencia al paso del flujo (Buján y cols., 1992a; Bellón y cols., 1993; Bellón y cols., 1997; García-Honduvilla y cols., 2008). Otros autores han utilizado células musculares lisas para llevar a cabo este mismo diseño, observando mediante un modelo *ex vivo* una notable mejora en la adhesión y retención de las células endoteliales (Yu y cols., 2003).

En el presente trabajo, para diseñar los diferentes constructos vasculares, hemos recubierto el lumen de los biomateriales de ePTFE con una solución de fibronectina a concentración 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados que hemos obtenido al analizar el comportamiento de WJC y Dif-WJC bajo condiciones de cultivo estáticas se asemejan

mucho al patrón de comportamiento de las células endoteliales y mesoteliales (Bellón y cols., 1992; Buján y cols., 1992a; Bellón y cols., 1994b; García-Honduvilla y cols., 1995; Bellón y cols., 1997; Buján y cols., 1998; García-Honduvilla y cols., 2008).

Una de las mayores complicaciones que nos encontramos a la hora de utilizar constructos vasculares sembrados con células, es lograr una buena retención celular en el constructo, una vez que éste se ve expuesto a las fuerzas ejercidas por el paso del flujo sanguíneo (Rademacher y cols., 2001). Generalmente, las células endoteliales sembradas sobre prótesis de ePTFE sufren una importante denudación; esta pérdida celular sucede principalmente durante los primeros 30-40 minutos tras la exposición al flujo, ya que durante este tiempo se desanclan del lumen protésico aproximadamente el 70% de las células (Xiao y Shi, 2004). Hay una serie de estudios que demuestran que el hecho de preconditionar a las células mediante circuitos de flujo *in vitro* o *ex vivo* previo a su implante *in vivo*, produce en las células una reorganización de los componentes del citoesqueleto, al tiempo que constituye un estímulo encaminado a la síntesis y depósito de componentes de matriz extracelular, lo que se traduce en una mayor retención celular una vez que el constructo se somete al estrés mecánico que supone el paso del torrente sanguíneo (Dardik y cols., 1999; Imverti y cols., 2002; Baguneid y cols., 2004; Vara y cols., 2008; Yazdani y cols., 2010; Vara y cols., 2011).

Nuestros resultados están en concordancia con estos hechos, pues hemos podido observar que, cuando nuestros constructos se someten a flujo pulsátil durante 1 h, las fuerzas de cizallamiento que actúan sobre el lumen protésico provocan una denudación en la superficie del biomaterial que ronda el 70-80%, tal y como habíamos observado previamente al someter a flujo una serie de constructos sembrados con células endoteliales (Bellón y cols., 1993).

5.2.3 Uso del ePTFE en la elaboración de constructos vasculares

A pesar de que el ePTFE ha sido el biomaterial más utilizado como sustituto vascular durante los últimos 30 años, en la actualidad no se ha conseguido encontrar ningún otro soporte que mejore el comportamiento de este biomaterial en el campo de la sustitución arterial en el ser humano. Desde sus inicios como herramienta de uso clínico, (Norton y Eiseman, 1975), el ePTFE se ha empleado en múltiples cirugías reparativas y reconstructivas. En los últimos años se han probado numerosas estrategias con el fin de optimizar el comportamiento de la superficie luminal de este tipo de prótesis: por ejemplo, los *stent* que se emplean en tratamientos endovasculares suelen estar tratados con sustancias anticoagulantes, como la heparina (Kwa y cols., 2010), mientras que las prótesis destinadas a realizar sustituciones arteriales o *bypass* pueden combinarse con diversas sustancias, tales como carbono activado (Kapfer y cols., 2006), inmunosupresores como la rapamicina (Cagiannos y cols., 2005), o anticoagulantes (Lösel-Sadée y Alefelder, 2009). El uso de estas sustancias está siempre encaminado a lograr modular el proceso de hiperplasia intimal, y con ello minimizar el riesgo de fracaso por oclusión.

En nuestro modelo experimental, hemos podido comprobar que el soporte de ePTFE seleccionado tiene un comportamiento similar al observado tanto en la clínica humana como en otros modelos experimentales. Nuestro biomaterial es hidrofóbico, impermeable y antiadherente. A pesar de esto, el ePTFE no es capaz de evitar que en algunas regiones de su lumen se produzca la adhesión de material trombogénico. La pared protésica es susceptible de sufrir una moderada infiltración celular en los tercios adventicial y luminal, a pesar de su baja porosidad (30 μm). Un pequeño porcentaje de esta población celular infiltrada corresponde con macrófagos activados, mientras que el resto está compuesto de otras células sanguíneas, fibroblastos adventiciales y, tal vez, células musculares lisas. En las zonas de anastomosis, sin embargo, la reacción macrofágica es muy intensa, y el biomaterial aparece rodeado de una cápsula fibrosa en la que abundan los macrófagos activados.

Para poder analizar la efectividad de los constructos vasculares que hemos diseñado, es necesario comprender en primer lugar cómo funcionan los mecanismos intrínsecos de la reparación arterial. Mediante el desarrollo de modelos murinos de autoinjerto (Buján y cols., 1992b; Bellón y cols., 1994b; Bellón y cols., 1996a-b; Pascual y cols., 2004b) y aloinjerto arterial (Rodríguez y cols., 2012), podemos analizar los procesos de reparación arterial y sus consecuencias tanto a corto (Buján y cols., 1995; Buján y cols., 1996; Buján y cols., 1997) como a largo plazo (Buján y cols., 1992c; Bellón y cols., 1996a-b; Pascual y cols., 2004b; Pascual y cols., 2005; Rodríguez y cols., 2011; Rodríguez y cols., 2012). Sabemos que el proceso cicatrizal que se origina tras una lesión es una respuesta rápida del organismo, que tiene como finalidad el restablecimiento de la homeostasis vascular. Los procesos inflamatorios e inmunes que intervienen en la respuesta cicatrizal pretenden conseguir unas tasas de migración, proliferación, crecimiento y diferenciación celular semejantes a las sucedidas durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, en la vida postnatal, las señales que regulan todos estos procesos son notablemente más leves, impidiendo la regeneración total del tejido lesionado.

En comparación con los embrionarios, los tejidos del organismo adulto tienen una menor capacidad de respuesta rápida ante una lesión, ya que las células que lo conforman se encuentran muy especializadas, y son por tanto menos reactivas. Para solventar esto cada tejido dispone de una población celular, generalmente en estado de quiescencia, que será capaz de responder rápidamente ante un estímulo lesivo, y actuará en favor de la reparación tisular, aunque no tendrá capacidad de regenerarlo por completo (Tavian y cols., 2005).

Cuando esta respuesta se produce tras llevar a cabo el implante de un sustituto vascular artificial, los mecanismos reparativos desencadenados pueden provocar estenosis en el injerto, lo que estaría relacionado con una posible reducción de la luz, pudiendo conllevar a la oclusión completa del injerto, lo que finalmente impediría el paso del flujo sanguíneo (Bia y cols., 2007). La hiperplasia intimal se ha descrito como

una de las principales causas de estenosis, especialmente en las regiones anastomóticas (Tordoir y cols., 2004).

El desarrollo de la hiperplasia intimal en los injertos protésicos se puede producir por varias causas, ya sean mecánicas o fisiológicas. Uno de los factores más influyentes es la diferencia en viscoelasticidad entre la arteria nativa y el propio biomaterial (Bia y cols., 2007). Otro factor a tener en cuenta es la interrupción de la continuidad en la capa endotelial a partir de las zonas de anastomosis, ya que la superficie irregular provoca turbulencias en el flujo sanguíneo que generalmente van acompañadas de migración celular y aumento del depósito de componentes de la matriz extracelular, lo que provoca la aparición de estenosis en el injerto (Khosla y Ahya, 2002; Vassalotti, 2004). También influyen otros factores, tales como la pérdida de *compliance* entre la arteria nativa y el injerto (Haruguchi y Teraoka, 2003), y la adhesión de material trombogénico, plaquetas y leucocitos a las paredes vascular y protésica (Bia y col., 2007). Finalmente, el estrés mecánico y las fuerzas de cizallamiento pueden provocar una fuerte denudación endotelial en las zonas perianastomóticas de la arteria nativa, facilitando la migración de células musculares lisas hacia el lumen protésico que proliferarán, dando lugar a una capa miointimal (Bellón y cols., 1994a; Haruguchi y Teraoka, 2003; Buján y cols., 2006a).

En nuestro estudio, los injertos del grupo control, carentes de siembra celular en su superficie luminal, han mostrado un índice medio de trombosis superior a los demás constructos, todos ellos sembrados con células. Cuantitativamente, estos injertos presentan una hiperplasia intimal significativamente mayor que los demás grupos experimentales, especialmente en la región distal, donde la oclusión es mayor. Estos resultados, consistentes con los publicados previamente (García-Honduvilla y cols., 2008), sugieren que la superficie hidrofóbica del ePTFE, al no tener recubrimiento alguno, podría representar un factor limitante, impidiendo que se lleve a cabo correctamente la endotelización transanastomótica. Al estar en contacto directo con el biomaterial, se desencadena un proceso de adsorción de proteínas a medida que el flujo

sanguíneo atraviesa el injerto (Holland y Marchant, 2000), lo que estimula la adhesión y agregación plaquetar; favoreciendo la activación de la cascada de coagulación y el consecuente depósito de material trombogénico, tal y como hemos observado en los injertos de este grupo experimental.

La estrategia de la siembra endotelial diseñada por Herring y colaboradores (Herring y cols., 1984) se podría considerar como el primer intento real de mejorar la superficie luminal de las prótesis vasculares inertes. Las células endoteliales no sólo constituyen uno de los pocos tipos celulares diferenciados con potencial antitrombogénico, sino que se encuentran de forma natural en la interfaz sangre-tejido, y son imprescindibles para el mantenimiento de la homeostasis vascular (Bordenave y cols., 2005). Por estos motivos, la combinación de células endoteliales y ePTFE podría crear un sustituto vascular más biocompatible, incrementando por tanto su permeabilidad a largo plazo.

Los resultados que hemos obtenido al analizar los constructos sembrados con HUVEC demuestran que este grupo experimental es el que mayor efectividad presenta en cuanto a tasa de permeabilidad, ya que tan sólo un 25% de los injertos presentó oclusión parcial por trombosis. La superficie endotelial de estos injertos muestra signos de normalidad, salvo en las zonas perianastomóticas, donde la capa celular se interrumpe y aparece asociada a material trombogénico. Estos datos son coherentes con los publicados previamente (García-Honduvilla y cols., 2008), y están en concordancia con los resultados obtenidos por diversos grupos, que realizaron ensayos clínicos en humanos utilizando células endoteliales autólogas para el recubrimiento de prótesis de Dacron® y ePTFE (Herring y cols., 1984b; Herring y cols., 1985; Herring y cols., 1987; Ortenwall y cols., 1987; Ortenwall y cols., 1989; Ortenwall y cols., 1990). Sin embargo, contrastan con otros ensayos en los que observaron fracaso de los injertos tanto a corto plazo -14 días- como a largo plazo -1 año- (Walker y cols., 1987; Zilla y cols., 1987; Fasol y cols., 1989; Smyth y cols., 1995). Este tipo de controversias, junto con las limitaciones inherentes a la obtención de células endoteliales autólogas,

generan la necesidad de buscar una estirpe celular alternativa para las diferentes aplicaciones de Ingeniería Tisular Vascular.

En nuestro caso, hemos seleccionado las células de la gelatina de Wharton como estirpe celular candidata. Tras un exhaustivo estudio sobre el comportamiento de estas células en cultivo, podemos afirmar que son una estirpe celular que presenta un fenotipo muy particular, pues además de ser considerada una estirpe mesenquimal, estas células comparten características con células de tipo fibroblastoide, aproximándose a ellas a medida que avanza el tiempo en cultivo.

Teniendo en cuenta las propiedades de estas células, diversos autores sostienen que las WJC se podrían utilizar como una fuente celular prometedora en diversas aplicaciones de Ingeniería Tisular Vascular y cardiovascular (Fan y cols., 2011). A pesar de esto, son pocos los trabajos publicados hasta la fecha en los que se evalúa el potencial de las WJC para las aplicaciones de Ingeniería Tisular Vascular.

Algunos de los trabajos más relevantes en relación al potencial de estas células en aplicaciones de Ingeniería Tisular Vascular y cardiovascular han sido publicados en la última década. Kadner y colaboradores utilizaron parches de ácido poliglicólico sobre los cuales sembraron de forma independiente células procedentes de distintas regiones del cordón umbilical -gelatina de Wharton, arteria y vena umbilical- (Kadner y cols., 2002; Kadner y cols., 2004). Al finalizar el periodo de estudio, observaron, al igual que nosotros, depósitos de colágeno y células activas con fenotipo fibroblastoide en todos los constructos. A pesar de no tener estudios dinámicos que reforzaran sus resultados, sugirieron que las WJC podrían ser, al igual que las células de arteria y vena umbilical, buenos candidatos para ser utilizados en el diseño de parches protésicos destinados a la reparación de defectos cardiovasculares. Utilizando el mismo biomaterial, Schmidt y colaboradores diseñaron un sustituto vascular artificial a partir de un soporte tubular sobre el que sembraron una matriz formada por WJC y a continuación una monocapa de células endoteliales progenitoras o HUVEC, dependiendo del grupo de estudio

(Schmidt y cols., 2006). Aunque sus experimentos no fueron validados mediante un modelo experimental *in vivo*, observaron que las WJC tenían la capacidad de organizarse en el interior del biomaterial, formando una capa pseudoadventicia y pseudomedia, que a su vez aportaba resistencia mecánica a la monocapa endotelial. El constructo resultante parecía tener, además, unas características biomecánicas comparables a las de los vasos sanguíneos nativos.

Al analizar nuestros constructos sembrados con células WJC y Dif.-WJC, hemos podido comprobar que el comportamiento de estos grupos experimentales es mejor que el del grupo control, aunque no alcanza la efectividad observada en los constructos sembrados con HUVEC, ya que la superficie de contacto con la sangre parece ser más trombogénica en este tipo de injertos que en los sembrados con células endoteliales. A pesar de no haber obtenido un índice de permeabilidad tan elevado como en el grupo ePTFE + HUVEC, es importante destacar que los constructos sembrados con las células diferenciadas hacia la línea endotelial, Dif.-WJC, son los que presentan una mayor estabilidad en relación con el espesor de la hiperplasia intimal. Consideramos que éste es un resultado relevante, y pensamos que este hecho pueda deberse, tal vez, a una competencia entre la capa miointimal neoformada y las propias células musculares de la túnica media del vaso receptor. Hemos podido observar que las células de la gelatina de Wharton, cuando están indiferenciadas, presentan fenotipo mesenquimal con ciertas propiedades de célula muscular lisa. Curiosamente, durante el proceso de diferenciación endotelial, estas células incrementan algunas de sus características de célula miofibroblastoide, como por ejemplo la presencia de filamentos de α -actina de músculo liso y desmina en su citoesqueleto, así como la síntesis de VEGF (Chintalgattu y cols., 2003). Podría suceder que el mecanismo intrínseco de estas células favorezca su diferenciación hacia la miofibroblastos, a pesar de tener un estímulo exógeno de diferenciación endotelial. Esta consideración es consistente con las observaciones de Wang y colaboradores (Wang SH y cols., 2009), que, utilizando un modelo murino de isquemia en extremidades inferiores, y tras implantar vía inyección intramuscular células de la gelatina de Wharton diferenciadas a la línea endotelial, observaron que éstas no

sólo eran capaces de migrar hacia la zona lesionada, sino que reducían de forma significativa el espesor de la hiperplasia intimal. El descubrimiento más relevante que hicieron fue observar que estas células eran capaces de producir y liberar al medio factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEGF). Motivados por este hallazgo, afirmaron que este factor de crecimiento era responsable de la disminución en la migración y proliferación de células musculares, basándose en que, bajo condiciones normales, el PEGF es secretado por las células endoteliales y actúa inhibiendo la proliferación y migración de células musculares.

Otro factor importante implicado en la remodelación arterial tras el implante de los constructos vasculares viene de la mano de la túnica adventicia. Según lo descrito en la literatura, las células presentes en la capa adventicial del tejido receptor podrían estar implicadas en la formación de la neoíntima (Díaz-Flores y cols., 1990; Christen y cols., 1999; Buján y cols., 2006a; Díaz-Flores y cols., 2007). Aunque la túnica adventicia se considera un tejido que aporta soporte estructural a los vasos sanguíneos, recientes observaciones afirman que las lesiones que afectan a esta capa, de alguna manera, inducen cambios patológicos en las túnicas íntima y media similares a los cambios provocados por una lesión en la capa endotelial (Ross, 1999; Coen y cols., 2011), por lo que se deduce que también puede estar implicada en los procesos de remodelación de las túnicas íntima y media (Stenmark y cols., 2006). Los miofibroblastos presentes en la adventicia juegan un papel importante, no sólo en la cicatrización del tejido (Gabbiani y cols., 1971) y el desarrollo fibrótico (Hinz y cols., 2007), sino también en la remodelación de la propia túnica adventicia (Shi y cols., 1996; Short y cols., 2004).

Diversas patologías vasculares, tanto intraluminales como perivasculares, pueden comprometer la estructura y función de la pared arterial (Coen y cols., 2011). Cuando se produce una lesión vascular, se activan una serie de mecanismos adaptativos, remodelando los componentes de la matriz extracelular, principalmente al nivel de la túnica adventicia (Glagov y cols., 1987). Estos mecanismos adaptativos, conocidos actualmente como “remodelación positiva” (Coen y cols., 2011), dependen de las

interacciones dinámicas entre los diversos factores de crecimiento, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos, generando cambios permanentes tanto en el lumen del vaso como en la estructura de su pared (Pasterkamp y cols., 1998; Coen y cols., 2011). Cuando estos mecanismos adaptativos reaccionan exageradamente, se produce una respuesta descontrolada o “remodelación negativa o constrictiva”, que suele conducir a la estenosis del lumen vascular, fomentando así la patogénesis vascular (Zalewski y Shi, 1997; Coen y cols., 2011). A diferencia de la positiva, la remodelación negativa está a menudo correlacionada con un elevado grado de estenosis, que se asocia generalmente con las patologías cardiovasculares crónicas.

La remodelación positiva, inducida por una reacción inflamatoria, actúa principalmente a través de un proceso proteolítico mediado por metaloproteasas de matriz. Este fenómeno supone una importante pérdida del componente colágeno, así como una reducción en el número de células musculares lisas, produciéndose un adelgazamiento en las tunicas media y adventicia que puede desembocar en una expansión de la pared vascular (Varnava y cols., 2002). Curiosamente, a pesar de que este tipo de remodelación provoca una cierta dilatación en el lumen vascular, también conlleva el riesgo de adhesión plaquetar, estenosis y trombosis (Pasterkamp y cols., 1998; Coen y cols., 2011).

Por el contrario, la remodelación negativa o constrictiva es un fenómeno dependiente del tiempo, mediado por la rápida proliferación de los fibroblastos presentes en la túnica adventicia -aproximadamente 3 días tras la lesión- y su progresión hacia miofibroblastos -entre 7 y 14 días tras la lesión-, produciendo un engrosamiento de la adventicia, que en este caso será rica en componente colágeno y en células (Coen y cols., 2011). De forma puntual, los miofibroblastos pueden sufrir apoptosis antes de que la arteria alcance la máxima contracción, dejando una cicatriz que perdurará en el tejido (Shi y cols., 1996). Otros factores como la reorganización de fibras de colágeno, y la síntesis y deposición de componentes elásticos actúan de forma notable en la

remodelación de la pared arterial (Shi y cols., 1997), hecho que hemos observado al analizar nuestros injertos, con independencia del grupo experimental.

La neoadventicia que recubre los diferentes constructos vasculares que hemos diseñado es compacta, de gran espesor y está muy vascularizada, demostrando la fuerte interacción de esta neocapa con los tejidos circundantes. Esta capa tiene un crecimiento a modo de lengüeta, cuyo origen se encuentra en las regiones perianastomóticas, y experimenta un crecimiento centrípeto hacia la región central del injerto. En todos los grupos experimentales, salvo en los constructos sembrados con WJC, la neoadventicia está formada principalmente por colágeno maduro de tipo I, lo que sugiere que la remodelación tisular está ya en un estado avanzado. Debido al elevado número de células de fenotipo fibroblastoide cohabitando en la capa neoadventicial; a la presencia de colágeno maduro en su composición; y a la evidente hiperplasia intimal producida en los constructos en los diferentes grupos experimentales, consideramos que el proceso de remodelación tisular, que se está produciendo en estos injertos a los 60 días post-implante es una remodelación de tipo negativo o constrictivo, bien por la agresividad de la lesión, bien por la incapacidad del biomaterial para dilatarse de la forma en que lo haría la túnica media del tejido receptor.

Para concluir, podemos afirmar que el proceso de remodelación tisular que se desencadena en la arteria femoral como consecuencia de implantar un constructo vascular de ePTFE se lleva a cabo de forma muy similar, con independencia del grupo experimental implantado. El biomaterial que actúa como soporte estructural no se integra con el tejido receptor ni se degrada, debido a su naturaleza inerte, ni provoca una exagerada reacción de cuerpo extraño, ya que el recuento macrofágico no alcanza niveles significativamente elevados.

En cuanto al diseño de los constructos, hemos comprobado que los formados por ePTFE + HUVEC presentan una mayor tasa de permeabilidad, debido en parte a la presencia en su lumen de una cubierta celular con propiedades antiagregantes y

antitrombogénicas, aunque su presencia no ha evitado que se desarrolle una hiperplasia intimal de espesor creciente a lo largo del eje proximal-distal. A pesar de tener una menor tasa de permeabilidad, los constructos de los grupos experimentales sembrados con células de la gelatina de Wharton son los que mejor comportamiento presentan en cuanto a la homogeneidad y estabilidad de su hiperplasia intimal, especialmente el grupo de ePTFE + Dif-WJC, cuya capa neoíntima tiene un espesor que se mantiene más o menos constante entre los extremos proximal y distal.

Esta homogeneidad en la hiperplasia intimal observada en los constructos vasculares sembrados con WJC y Dif-WJC nos lleva a pensar en la posibilidad de utilizar las células de la gelatina de Wharton en aplicaciones de Ingeniería Tisular Vascular, no para diseñar un endotelio artificial, sino para crear una túnica media estable que favorezca la adhesión de las células endoteliales, favoreciendo así la presencia de una túnica íntima funcional y resistente, que module en la medida de lo posible el desarrollo de la hiperplasia intimal tras llevar a cabo el injerto.

5.3 CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

En un intento de resumir todos los resultados obtenidos tras el estudio de la población de células de la gelatina de Wharton y su potencial uso en aplicaciones de Ingeniería Tisular Vascular, podemos decir que estas células constituyen una población indiferenciada, con capacidad proliferativa y autorrenovadora, y aspecto fenotípico a medio camino entre fibroblastoide y miofibroblastoide. Estas características pueden sernos útiles a la hora de dirigir la diferenciación y el posterior uso de estas células hacia un fin concreto, ya que presentan cierta plasticidad que nos permite pensar en la posibilidad de utilizarlas en diversas aplicaciones.

A pesar de no haber logrado mediante nuestros modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* una diferenciación endotelial plenamente funcional, creemos que estas células podrían tener un espacio en el diseño de constructos vasculares destinados a la reparación arterial. Hemos observado en la población de células de la gelatina de Wharton un potencial intrínseco de diferenciación hacia la línea miofibroblastoide. Estas células no sólo presentan un citoesqueleto positivo para desmina y α -actina de músculo liso, sino que producen y liberan al medio el factor de crecimiento VEGF y, además, desarrollan un crecimiento en multicapa muy estable tanto en frascos de cultivo como en soportes protésicos. Es gracias a estas propiedades que nos permitimos plantearnos la posibilidad de que las WJC puedan utilizarse en aplicaciones de Ingeniería Tisular Vascular, mediante la fabricación de constructos que presenten una túnica “pseudo-media” diseñada en base a esta estirpe celular.

En la actualidad apenas hay datos relevantes acerca del potencial de diferenciación de esta estirpe hacia la población de células musculares lisas; sin embargo, en los últimos años se han documentado notables avances con respecto al potencial de diferenciación miogénica de esta estirpe celular, ya que se ha demostrado que las WJC son capaces de desarrollar un fenotipo contráctil y tienen propiedades que las permitirían ser utilizadas en la reparación de patologías musculares (Conconi y cols.,

2006; Kocafe y cols., 2010; Farias y cols., 2011; Wang L y cols., 2011). No es descabellado, por tanto, pensar que estas células tengan también un potencial de diferenciación no sólo hacia músculo esquelético, sino también hacia la línea muscular lisa.

Todos estos resultados y argumentos nos motivan cada vez más a continuar con esta línea de investigación, con el fin de profundizar, tanto como nos sea posible, en el estudio de esta población celular tan particular y validar su potencial uso terapéutico en aplicaciones de Ingeniería Tisular aplicada al territorio vascular.

Capítulo 6

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos tras llevar a cabo nuestro modelo experimental *in vitro*, de intento de condicionar las células mesenquimales de la gelatina de Wharton hacia la línea endotelial, podemos establecer las siguientes conclusiones:

- Bajo nuestras condiciones experimentales, las células de la gelatina de Wharton (WJC) presentan un perfil fenotípico con características de células mesenquimales comprometidas hacia la línea fibroblástica.
- El protocolo empleado para llevar a cabo la diferenciación endotelial no ha mostrado eficacia en su objetivo, ya que la población celular condicionada resultante (Dif-WJC) ha continuado su progresión y maduración desde la línea fibroblástica hacia la miofibroblástica.

Todo lo anterior nos permite rechazar nuestra primera **HIPÓTESIS** planteada:

“¿Son las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical una estirpe celular mesenquimal capaz de diferenciarse hacia la línea endotelial?”

Afirmando que, bajo las condiciones experimentales diseñadas, las células de la gelatina de Wharton constituyen una población celular de tipo mesenquimal especializado, y no sensible a un medio de diferenciación endotelial.

Hemos ampliado nuestro estudio con un modelo experimental *in vivo*, en el cual las distintas poblaciones celulares estudiadas, se encontrasen en una situación más cercana a la realidad buscada, es decir, en el lecho vascular, donde los factores ambientales (mecánicos, tróficos, etc.) podrían conducir a las células de la gelatina de Wharton hacia la línea endotelial. Por este motivo, nos planteamos el diseño de

constructos vasculares con las distintas poblaciones celulares, constituyendo así el segundo de nuestros objetivos.

Tras llevar a cabo el modelo experimental *in vivo*, podemos concluir que:

- Las distintas poblaciones celulares estudiadas (HUVEC, WJC, Dif-WJC) poseen un patrón de comportamiento similar, dando lugar a la formación de una cobertura celular sobre la superficie luminal del ePTFE.

En el proceso de reparación del lecho arterial tras la interposición de los distintos equivalentes tisulares, hemos valorado los parámetros trombogenicidad y reestenosis como los hechos más significativos de la evolución de la permeabilidad del injerto vascular. De los resultados obtenidos podemos concluir que:

- La trombogenicidad de los constructos se ve reducida ante la interposición de una capa celular en la interfaz sangre-biomaterial. La eficacia de la túnica sembrada aumenta significativamente en el caso de las células endoteliales, en comparación con las células de la gelatina de Wharton, ya sea la población celular indiferenciada o la condicionada a diferenciación.
- La respuesta reparadora, medida como hiperplasia intimal o reestenosis arterial, disminuye con la siembra celular. De los distintos grupos estudiados, el que ha presentado un mejor comportamiento, no sólo en cuanto a la obtención de una capa neointimal estable, sino también a su grado de desarrollo que favorezca el mantenimiento de la permeabilidad en el injerto, ha sido el grupo experimental con siembra de células de la gelatina de Wharton diferenciadas (Dif-WJC).

Por tanto, podemos elevar nuestra segunda **HIPÓTESIS** planteada:

“¿ Pueden estas células mejorar la permeabilidad de las prótesis de ePTFE de pequeño calibre?”

A la categoría de **TESIS**, afirmando que:

Las células mesenquimales diferenciadas de la gelatina de Wharton favorecen la formación de una capa neointimal de menor espesor y de características más estables que las otras estirpes celulares estudiadas, lo que podría permitir a estas células colaborar en la reducción de los procesos de reestenosis desencadenados en la prótesis vascular.

Capítulo 7

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res* 2004; 95(7): 671-6.

Alaminos M, Pérez-Köhler B, Garzón I, García-Honduvilla N, Romero B, Campos A, Buján J. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 2010; 223(3): 640-7.

Alison MR, Brittan M, Lovell MJ, Wright NA. Markers of adult tissue-based stem cells. *Handb Exp Pharmacol* 2006; (174): 185-227.

Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 1995; 220(1): 194-200.

Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 1997; 75(5): 430-45.

Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med* 2001; 7(4): 393-5.

Angelucci S, Marchisio M, Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Sulpizio M, Eleuterio E, Lanuti P, Sabatino G, Miscia S, Di Ilio C. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion. *Proteome Sci* 2010; 8:18.

Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, Zummo G, Farina F, La Rocca G. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev* 2010; 19(4): 423-38.

Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes I, Toro FJ, Blanco FJ. Umbilical cord as a mesenchymal stem cell source for treating joint pathologies. *World J Orthop* 2011; 2(6): 43-50.

Ayuzawa R, Doi C, Rachakatla RS, Pyle MM, Maurya DK, Troyer D, Tamura M. Naïve human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2009; 280(1): 31-7.

Baba K, Yamazaki Y, Ikemoto S, Aoyagi K, Takeda A, Uchinuma E. Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived autoserum. *J Craniomaxillofac Surg* 2012. PMID: 22503080

Bacigalupo A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004; 17(3): 387-99.

Baguneid M, Murray D, Salacinski HJ, Fuller B, Hamilton G, Walker M, Seifalian AM. Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes. *Biotechnol Appl Biochem* 2004; 39(Pt 2): 151-7.

Baergen RN. Pathology of the Umbilical Cord. En: *Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta*, 1^a ed. Springer Science + Business Media Inc, NY, USA, 2005; pp. 249-78.

Bailey MM, Wang L, Bode CJ, Mitchell KE, Detamore MS. A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage. *Tissue Eng* 2007; 13(8): 2003-10.

Bakhshi T, Zabriskie RC, Bodie S, Kidd S, Ramin S, Paganessi LA, Gregory SA, Fung HC, Christopherson KW 2nd. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion* 2008; 48(12): 2638-44.

Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007; 25(6): 1384-92.

Balasubramanian S, Venugopal P, Sundarraj S, Zakaria Z, Majumdar AS, Ta M.. Comparison of chemokine and receptor gene expression between Wharton's jelly and bone marrow-derived. *Cytotherapy* 2012; 14(1): 26-33.

Bankowski E. Collagen of the umbilical cord and its alteration in EPH-gestosis (preeclampsia). *Proc Indian Acad Sci Chem Sci* 1999; 111: 207-13.

Bär H, Strelkov SV, Sjöberg G, Aebi U, Herrmann H. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol* 2004; 148(2): 137-52.

Battula VL, Trembl S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, Müller I, Schewe B, Skutella T, Fibbe WE, Kanz L, Bühring HJ. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* 2009; 94(2): 173-84.

Bellón JM, Buján J, Navlet J, Gianonatti MC, Hernando A, García-Honduvilla N, Turégano F. Siembra de células endoteliales porcinas sobre un substrato de politetrafluoroetileno (PTFE): Estudio experimental. *Angiologia* 1992; 44(3): 95-101.

Bellón JM, Buján J, Honduvilla NG, Hernando A, Navlet J. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular prostheses coated with a fibroblastic matrix. *Ann Vasc Surg* 1993; 7(6): 549-55.

Bellón JM, Buján J. Estado actual de los mecanismos de reparación de la lesión vascular: la hiperplasia intimal. *Angiologia* 1994a; 46(1): 1-6.

Bellón JM, Buján J, García-Honduvilla N, Minguela F, Hernando A. Utilidad de las células mesoteliales obtenidas de epiplon humano para el recubrimiento de prótesis vasculares de politetrafluoroetileno (PTFE). Estudio comparativo con células endoteliales de vena umbilical. *Angiologia* 1994b; 46(1): 44-8.

Bellón JM, Buján J, Jurado F, Hernando A, Honduvilla NG, Dominguez B. Cyclosporin A delays the presentation of intimal hyperplasia in an experimental model of arterial autograft. *Eur Surg Res* 1996a; 28(1): 39-48.

Bellón JM, Jurado F, De Miguel MP, Fraile B, Buján J. Long-term behavior of an arterial autograft: a new role for intimal hyperplasia? *Int J Microcirc Clin Exp* 1996b; 16(5): 240-9.

Bellón JM, García-Honduvilla N, Escudero C, Gimeno MJ, Contreras L, de Haro J, Buján J. Mesothelial versus endothelial cell seeding: evaluation of cell adherence to a fibroblastic matrix using ¹¹¹In oxine. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13(2): 142-8.

Bellón JM, Bajo A, Ga-Honduvilla N, Gimeno MJ, Pascual G, Guerrero A, Buján J. Fibroblasts from the transversalis fascia of young patients with direct inguinal hernias show constitutive MMP-2 overexpression. *Ann Surg* 2001; 233(2): 287-91.

Bellón JM, García-Honduvilla N, López R, Corrales C, Jurado F, Buján J. In vitro mesothelialization of prosthetic materials designed for the repair of abdominal wall defects. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14(4): 359-64.

Bellón JM, García-Honduvilla N, Rodríguez M, Pascual G, Gómez-Gil V, Buján J. Influence of the structure of new generation prostheses on shrinkage after implant in the abdominal wall. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 78(2): 340-6.

Berger K, Sauvage L, Rao A, Wood S. Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg* 1972; 175(1): 118-2.

Bhandari DR, Seo KW, Sun B, Seo MS, Kim HS, Seo YJ, Marcin J, Forraz N, Roy HL, Larry D, Colin M, Kang KS. The simplest method for in vitro β -cell production from human adult stem cells. *Differentiation* 2011; 82(3): 144-52.

Bia D, Barmak W, Zócalo Y, Galli C, Pérez-Campos H, Saldias M, Silva W, Álvarez I, Cabrera-Fischer EI, Armentano R. Hemodialysis access failure: viscoelastic vascular properties an intimal hyperplasia development. *Lat Am Appl Res* 2007; 37(2): 121-5.

Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22(4): 625-34.

Blakemore AH, Voorhees AB Jr. The use of tubes constructed from vinyon N cloth in bridging arterial defects; experimental and clinical. *Ann Surg* 1954; 140(3): 324-34.

Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44(4): 215-30.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.

Bordenave L, Fernandez P, Rémy-Zolghadri M, Villars S, Daculsi R, Midy D. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005; 33(3): 227-34.

Brinton MR, Stewart RJ, Cheung AK, Christensen DA, Shiu YT. Modelling ultrasound-induced mild hyperthermia of hyperplasia in vascular grafts. *Theor Biol Med Model* 2011; 8: 42.

Brown MA, Wallace CS, Angelos M, Truskey GA. Characterization of umbilical cord blood-derived late outgrowth endothelial progenitor cells exposed to laminar shear stress. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(11): 3575-87.

Budd JS, Bell PRF, James RFL. Attachment of indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Br J Surg* 1989; 76: 1259-61.

Buján J, Bellón JM, Navlet JG, Honduvilla N, Hernando A, Turegano F. Seeding of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) vascular grafts. A morphological study of porcine endothelial and fibroblast cells. *Histol Histopathol* 1992a; 7(4): 635-42.

Buján J, Bellón JM, Gianonatti MC, Golitsin A. Intimal thickening in arterial autografts. Role of the adventitial layer. *Histol Histopathol*. 1992b; 7(2): 189-97.

Buján J, Bellón JM, Golitsin A, Gianonatti C, Turegano F. Lack of intimal hyperplasia response in an experimental model of non-endothelial vascular wall damage. *Histol Histopathol* 1992c; 7(4): 693-702.

Buján J, Bellón JM, Jurado F, Hernando A, Contreras L. Assessment of cyclosporine A-induced ultrastructural changes in vascular wall using an experimental arterial autograft model. *Histol Histopathol* 1995; 10(3): 567-76.

Buján J, Bellón JM, Jurado F, Dominguez B, Gimeno MJ, García-Honduvilla N, Hernando A. Inhibitor of angiotensin-converting enzyme modifies myointimal origin in an arterial autograft model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28(2): 285-93.

Buján J, Bellón JM, Jurado F, García-Honduvilla N, Gimeno MJ, Escudero C, Alvarez MV, González-Rodríguez J. Inhibition of the intimal hyperplasia in an arterial autograft model by blockade of the N-terminal of the integrin beta3 subunit by monoclonal antibody P37. *Platelets* 1997; 8(5): 337-47.

Buján J, García-Honduvilla N, Contreras L, Gimeno MJ, Escudero C, Bellón JM, San-Román J. Coating PTFE vascular prostheses with a fibroblastic matrix improves cell retention when subjected to blood flow. *J Biomed Mater Res* 1998; 39(1): 32-9.

Buján J, García-Honduvilla N, Bellón JM. Engineering conduits to resemble natural vascular tissue. *Biotechnol Appl Biochem* 2004; 39(Pt 1): 17-27.

Buján J, Pascual G, Corrales C, Gómez-Gil V, Rodríguez M, Bellón JM. Muscle-derived stem cells in tissue engineering: defining cell properties suitable for construct design. *Histol Histopathol* 2005; 20(3): 891-9.

Buján MJ, García-Honduvilla N, Bellón JM. Hiperplasia intimal. En: *Tratado de las Enfermedades Vasculares*, 1ª ed. Viguera Editores SL, Spain, 2006a; pp. 903-13.

Buján J, Pascual G, Corrales C, Gómez-Gil V, García-Honduvilla N, Bellón JM. Muscle-derived stem cells used to treat skin defects prevent wound contraction and expedite reepithelialization. *Wound Repair Regen* 2006b; 14(2): 216-23.

Cagiannos C, Abul-Khoudoud OR, DeRijk W, Shell DH 4th, Jennings LK, Tolley EA, Handorf CR, Fabian TC. Rapamycin-coated expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts exhibit decreased anastomotic neointimal hyperplasia in a porcine model. *J Vasc Surg* 2005; 42(5): 980-8.

Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(11): 2886-95.

Capelli C, Gotti E, Morigi M, Rota C, Weng L, Dazzi F, Spinelli O, Cazzaniga G, Trezzi R, Gianatti A, Rambaldi A, Golay J, Introna M. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. *Cytotherapy* 2011; 13(7): 786-801.

Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2006 6; 4:8.

Carrel A, Burrows MT. Cultivation of tissues in vitro and its technique. *J Exp Med* 1911; 13(3): 387-96.

Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Del Maschio A, Breviario F, Lampugnani MG, Dejana E. Structural characteristics and functional role of endothelial cell to cell junctions. *Endothelium* 1994; 2: 1-10.

Chacko AW, Reynolds SRM. Architecture of distended and nondistended human umbilical cord tissues, with special reference to the arteries and veins. *Contrib Embryol* 1954; 35: 135-50.

Chan RW, Rodríguez ML, McFetridge PS. The human umbilical vein with Wharton's jelly as an allogeneic, acellular construct for vocal fold restoration. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(11): 3537-46.

Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One* 2008; 3(1): e1451.

Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2009; 37(5): 629-40.

Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(3): 277-86.

Chlupác J, Filová E, Bacáková L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res* 2009; 58 Suppl 2: S119-39.

Chlupác J, Filová E, Bacáková L. Vascular prostheses: 50 years of advancement from synthetic towards tissue engineering and cell therapy. *Rozhl Chir* 2010; 89(1): 85-94.

Cho M, Lee EJ, Nam H, Yang JH, Cho J, Lim JM, Lee G. Human feeder layer system derived from umbilical cord stromal cells for human embryonic stem cells. *Fertil Steril* 2010; 93(8): 2525-31.

Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP, Harris IR, Popma SH, Sachs DH, Huang CA. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood* 2008; 111(1): 430-8.

Cho SW, Lim SH, Kim IK, Hong YS, Kim SS, Yoo KJ, Park HY, Jang Y, Chang BC, Choi CY, Hwang KC, Kim BS. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. *Ann Surg* 2005; 241(3): 506-15.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-9.

Chowcat N, Savege F, Lewis M, Boulos P. Direct measurement of collagenase in colonic anastomosis. *Br J Surg* 1990; 77: 1284-7.

Christen T, Bochaton-Piallat ML, Neuville P, Rensen S, Redard M, van Eys G, Gabbiani G. Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation. *Circ Res* 1999; 85(1): 99-107.

Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK. Isolation and characterization of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *J Med Assoc Thai* 2009; 92 Suppl 3: S88-94.

Ciavarella S, Dammacco F, De Matteo M, Loverro G, Silvestris F. Umbilical cord mesenchymal stem cells: role of regulatory genes in their differentiation to osteoblasts. *Stem Cells Dev* 2009; 18(8): 1211-20.

Clavel C, Polette M, Doco M, Binniger Y, Birembaut P. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bull Cancer* 1992; 79: 261-70.

Coen M, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Myofibroblast-mediated adventitial remodeling: an underestimated player in arterial pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(11): 2391-6.

Collet GDM, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005; 96: 930-8.

Collins K. Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(3): 378-383.

Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, Bo P, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med* 2006; 18(6): 1089-96

Contreras MA, Quist WC, LoGerfo FW. Effect of porosity on small-diameter vascular graft healing. *Microsurgery* 2000; 20(1): 15-21.

Cook HJ. Thomas Wharton's Adenographia, first published in London in 1656. *Med Hist* 1998; 42(3): 411-2.

Corradetti B, Lange-Consiglio A, Barucca M, Cremonesi F, Bizzaro D. Size-sieved subpopulations of mesenchymal stem cells from intervacular and perivascular equine umbilical cord matrix. *Cell Prolif* 2011; 44(4): 330-42.

Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 2005; 438(7070): 937-45.

Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(9): 1179-83.

Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 2008; 36(5): 642-54.

Critser PJ, Voytik-Harbin SL, Yoder MC. Isolating and defining cells to engineer human blood vessels. *Cell Prolif* 2011; 44 Suppl 1: 15-21.

Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol* 2010; 185(11): 6617-23.

Dahl SL, Blum JL, Niklason LE. Bioengineered Vascular Grafts: Can We Make Them Off-the-Shelf? *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21(3): 83-9.

Danishefsky I, Bella A Jr. The sulfated mucopolysaccharides from human umbilical cord. *J Biol Chem* 1966; 241(1): 143-6.

Dardik A, Liu A, Ballermann BJ. Chronic in vitro shear stress stimulates endothelial cell retention on prosthetic vascular grafts and reduces subsequent in vivo neointimal thickness. *J Vasc Surg* 1999; 29(1): 157-67.

Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Hervé P, Etievent JP, Kantelip JP. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003; 108 Suppl 1: II253-8.

Dauids L, Dower T, Zilla P. The lack of healing in conventional vascular grafts. En: *Tissue Engineering of Vascular Prosthetic Grafts*, 1^a ed. R.G. Landes Company, TX, USA, 1999; pp. 3-44.

De Angelis E, Moss SH, Pouton CW. Endothelial cell biology and culture methods for drug transport studies. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; 18: 193-218.

De Valence S, Tille JC, Mugnai D, Mrowczynski W, Gurny R, Möller M, Walpoth BH. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials* 2012; 33(1): 38-47.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000; 28(8): 875-84.

Dejana E, Del Maschio A. Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thromb Haemost* 1995; 74: 309-12.

Dejana E. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 1996; 98(9): 1949-53..

Diao Y, Ma Q, Cui F, Zhong Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: osteogenesis in vivo as seed cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2009; 91(1): 123-31.

Díaz-Flores L, Valladares F, Gutierrez R, Varela H. The role of the pericytes of the adventitial microcirculation in the arterial intimal thickening. *Histol Histopathol* 1990; 5: 145-53.

Díaz-Flores L Jr, Madrid JF, Gutiérrez R, Varela J, Valladares F, Díaz-Flores L. Cell contribution of vasa-vasorum to early arterial intimal thickening formation. *Histol Histopathol* 2007; 22: 1379-86.

Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995; 77: 863-8.

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* 2006; 8(4): 315-7.

Dorigo W, Pulli R, Piffaretti G, Castelli P, Griselli F, Dorrucchi V, Ferilli F, Ottavi P, De Blasis G, Scalisi L, Monaca V, Battaglia G, Vecchiati E, Casali G, Pratesi C. Results from an Italian multicentric registry comparing heparin-bonded ePTFE graft and autologous saphenous vein in below-knee femoro-popliteal bypasses. *J Cardiovasc Surg* 2012; 53(2): 187-94.

Ehringer WD, Yamany S, Steier K, Farag A, Roisen FJ, Dozier A, Miller FN. Quantitative image analysis of F-actin in endothelial cells. *Microcirculation* 1999; 6: 291-303.

Ennis J, Götherström C, Le Blanc K, Davies JE. In vitro immunologic properties of human umbilical cord perivascular cells. *Cytotherapy* 2008a; 10(2): 174-81.

Ennis J, Sarugaser R, Gomez A, Baksh D, Davies JE. Isolation, characterization, and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods Cell Biol* 2008b; 86: 121-36.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109(1): 235-42.

Erickson HP. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 869-76.

Esquivel CO, Blaisdell FW. Why small caliber vascular grafts fail: a review of clinical and experimental experience and the significance of the interaction of blood at the interface. *J Surg Res* 1986; 41(1): 1-15.

Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2011; 7(1): 195-207.

Farias VA, Linares-Fernández JL, Peñalver JL, Payá Colmenero JA, Ferrón GO, Duran EL, Fernández RM, Olivares EG, O'Valle F, Puertas A, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. *Placenta* 2011; 32(1): 86-95.

Fasol R, Zilla P, Deutsch M, Grimm M, Fischlein T, Laufer G. Human endothelial cell seeding: evaluation of its effectiveness by platelet parameters after one year. *J Vasc Surg* 1989; 9(3): 432-6.

Ferguson VL, Dodson RB. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144 Suppl 1: S108-13.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.

Feugier P, Black RA, Hunt JA, How TV. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials* 2005; 26(13): 1457-66.

Filioli-Uranio M, Valentini L, Lange-Consiglio A, Caira M, Guaricci AC, L'Abbate A, Catacchio CR, Ventura M, Cremonesi F, Dell'Aquila ME. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev* 2011; 78(5): 361-73.

Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod Biomed Online* 2007; 15(6): 708-18.

Fong CY, Subramanian A, Biswas A, Gauthaman K, Srikanth P, Hande MP, Bongso A. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. *Reprod Biomed Online* 2010; 21(3): 391-401.

Fong CY, Chak LL, Biswas A, Tan JH, Gauthaman K, Chan WK, Bongso A. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2011; 7(1): 1-16.

Fong CY, Gauthaman K, Cheyyatraivendran S, Lin HD, Biswas A, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium support hematopoietic stem cell expansion ex vivo. *J Cell Biochem* 2012; 113(2): 658-68.

Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* 2011; 44 Suppl 1: 60-9.

Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 2005; 34(5): 415-23.

Franc S, Rousseau JC, Garrone R, van der Rest M, Moradi-Améli M. Microfibrillar composition of umbilical cord matrix: characterization of fibrillin, collagen VI and intact collagen V. *Placenta* 1998; 19(1): 95-104.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa S, Lueria E. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2(2): 83-92.

Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13(12): 1477-86.

Fu YS, Shih YT, Cheng YC, Min MY. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *J Biomed Sci* 2004; 11(5): 652-60.

Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, Shih YH, Ko MH, Sung MS. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* 2006; 24(1): 115-24.

Fujiwara H, Saiki Y, Sato M, Sakamoto N, Ohashi T, Sato M, Tabata Y, Tabayashi K. Modification of the descending thoracic aortic anastomotic site using biodegradable felt: study in a canine model with or without basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 2010; 51(1): 194-202.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992; 326(4): 242-50.

Gabella G. Structural apparatus for force transmission in smooth muscles. *Physiol Rev* 1984; 64: 455-77.

Gabbiani G, Ryan G, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27: 549-50.

Gan Q, Yoshida T, McDonald OG, Owens GK. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells". *Stem Cells* 2007; 25: 2-9.

Gang EJ, Jeong JA, Han S, Yan Q, Jeon CJ, Kim H. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2006; 8(3): 215-27.

Ganta C, Chiyo D, Ayuzawa R, Rachakatla R, Pyle M, Andrews G, Weiss M, Tamura M, Troyer D. Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation. *Cancer Res* 2009; 69(5): 1815-20.

García-Honduvilla N, Buján J, Lizarbe MA, Bellón JM, Olmo N, Hernando A. Adhesion and stability of fibronectin on PTFE before and after seeding with normal and synchronized endothelial cells: in vitro study. *Artif Organs* 1995; 19(2): 144-53.

García-Honduvilla N, Domínguez B, Pascual G, Escudero C, Minguela F, Bellón JM, Buján J. Viability of engineered vessels as arterial substitutes. *Ann Vasc Surg* 2008; 22(2): 255-65.

Garzón I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martín-Piedra MA, García-Honduvilla N, Buján J, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(6): 408-19.

Gauthaman K, Yee FC, Cheyyatraivendran S, Biswas A, Choolani M, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cell (hWJSC) extracts inhibit cancer cell growth in vitro. *J Cell Biochem*. 2012a; 113(6): 2027-39.

Gauthaman K, Fong CY, Suganya CA, Subramanian A, Biswas A, Choolani M, Bongso A. Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2012b; 24(2): 235-46.

Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; 92: 1686-96.

Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1974; 60(3): 673-84.

Gimeno MJ, González J, Rodríguez M, Corrales C, Bellón JM, Buján J. Potential role of a new anti-beta3 integrin antibody in the development of intimal hyperplasia after vascular surgery: an in vitro smooth muscle cell model. *Histol Histopathol* 2001; 16(3): 821-6.

Girdlestone J, Limbani VA, Cutler AJ, Navarrete CV. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions. *Cytotherapy* 2009; 11(6): 738-48.

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316: 1371-5.

Gogiel T, Bankowski E, Jaworski S. Proteoglycans of Wharton's jelly. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(10): 1461-9.

Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2003; 288(1): 51-9.

Goldsmith JC, Mc Cormick JJ, Yen A. Endothelial cell cycle kinetics. Changes in culture and correlation with endothelial properties. *Lab Invest* 1984; 51: 643-7.

Gómez-Aristizábal A, Hanoun L, Sarugaser R, Davies J. Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs) display high proliferative capacity but no telomerase activity. International Society for Stem Cell Research, Deefield, IL, 2006.

Gómez-Gil V, Pascual G, García-Honduvilla N, Rodríguez M, Buján J, Bellón JM. Characterizing omental adhesions by culturing cells isolated from a novel in vivo adhesion model. *Wound Repair Regen* 2009; 17(1): 51-61.

Gómez-Millán J, Katz IS, Farias VD, Linares-Fernández JL, López-Peñalver J, Ortiz-Ferrón G, Ruiz-Ruiz C, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. The importance of bystander effects in radiation therapy in melanoma skin-cancer cells and umbilical-cord stromal stem cells. *Radiother Oncol* 2011. *Radiother Oncol* 2012; 102(3): 450-8.

Gong Z, Niklason LE. Blood vessels engineered from human cells. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16(5): 153-6.

Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7(11): 581-8.

Gossner J, Larsen J. Tandem aneurysms of an internal mammary-aortocoronary bypass graft. *Neth Heart J* 2009; 17(7-8): 300-2.

Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993; 69(5): 508-17.

Graham LM, Burkel WE, Ford JW, Vinter DW, Kahn RH, Stanley JC. Expanded polytetrafluoroethylene vascular prostheses seeded with enzymatically derived and cultured canine endothelial cells. *Surgery* 1982; 91(5): 550-9.

Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003; 108(21): 2710-5.

Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak JM. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2007; 11(5): 935-44.

Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005; 85: 979-1000.

Hamilton G. Materiales de injerto: pasado y futuro. En: *Mecanismos de la Enfermedad Vascolar*, 1ª ed. Grupo ARS XXI de Comunicación, Spain, 2009; pp. 371-87.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-60.

Haruguchi H, Teraoka S. Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. *J Artif Organs* 2003; 6(4): 227-35.

He H, Shirota T, Yasui H, Matsuda T. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126(2): 455-64.

Heimli H, Kähler H, Endresen MJ, Henriksen T, Lyberg T. A new method for isolation of smooth muscle cells from human umbilical cord arteries. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57(1): 21-9.

Hernández-Ramírez P, Dorticós E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2004; 20(3): 1-19.

Hernando A, García-Honduvilla N, Bellón JM, Buján J, Navlet J. Coatings for vascular prostheses: mesothelial cells express specific markers for muscle cells and have biological activity similar to that of endothelial cells. *Eur J Vasc Surg* 1994; 8(5): 531-6.

Herring M, Gardner A, Glover J. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery* 1978; 84(4): 498-504.

Herring M, Baughman S, Glover J, Kesler K, Jesseph J, Campbell J, Dilley R, Evan A, Gardner A. Endothelial seeding of Dacron and polytetrafluoroethylene grafts: the cellular events of healing. *Surgery* 1984a; 96(4): 745-55.

Herring MB, Gardner A, Glover J. Seeding human arterial prostheses with mechanically derived endothelium: The detrimental effect of smoking. *J Vasc Surg* 1984b; 1: 279-89.

Herring MB, Baughman S, Glover J. Endothelium develops on seeded human arterial prostheses: A brief clinical note. *J Vasc Surg* 1985; 2: 727-30.

Herring MB, Compton RS, LeGrand DR, Gardner AL, Madison DL, Glover J. Endothelial seeding of polytetrafluoro-ethylene popliteal bypasses: A preliminary report. *J Vasc Surg* 1987; 6: 114-8.

Hinek A, Boyle J, Rabinovitch M. Vascular smooth muscle cell detachment from elastin and migration through elastic laminae is promoted by chondroitin sulfate-induced

"shedding" of the 67-kDa cell surface elastin binding protein. *Exp Cell Res* 1992; 203: 344-53.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007; 170: 1807-16.

Ho PJ, Yen ML, Lin JD, Chen LS, Hu HI, Yeh CK, Peng CY, Lin CY, Yet SF, Yen BL. Endogenous KLF4 expression in human fetal endothelial cells allows for reprogramming to pluripotency with just Oct3/4 and SOX2--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(10): 1905-7.

Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE Jr. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng* 2000; 6:75-9.

Hoerstrup SP, Kadner A, Breymann C, Maurus CF, Guenter CI, Sodian R, Visjager JF, Zund G, Turina MI. Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg* 2002; 74(1): 46-52.

Holland NB, Marchant RE. Individual plasma proteins detected on rough biomaterials by phase imaging AFM. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 307-15.

Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 2007; 19(10): 2003-12.

Horejsí V, Vlcek C. Novel structurally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. *FEBS Lett* 1991; 288(1-2): 1-4.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy.

Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5): 393-5.

Hou T, Xu J, Wu X, Xie Z, Luo F, Zhang Z, Zeng L. Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(9): 2325-34.

Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, Sand T, Mitchell KE. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362(2): 347-53.

Huang P, Lin LM, Wu XY, Tang QL, Feng XY, Lin GY, Lin X, Wang HW, Huang TH, Ma L. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro. *J Cell Biochem* 2010; 109(4): 747-54.

Huang AH, Niklason LE. Engineering biological-based vascular grafts using a pulsatile bioreactor. *J Vis Exp* 2011; (52). pii: 2646. doi: 10.3791/2646. PMID:21694696

Imai K, Shikata H, Okada Y. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett* 1995; 369(2-3): 249-51.

Imbert E, Poot AA, Figdor CG, Feijen J. Different growth behaviour of human umbilical vein endothelial cells and an endothelial cell line seeded on various polymer surfaces. *Biomaterials* 1998; 19(24): 2285-90.

Imberti B, Seliktar D, Nerem RM, Remuzzi A. The response of endothelial cells to fluid shear stress using a co-culture model of the arterial wall. *Endothelium* 2002; 9(1): 11-23.

Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15(7): 1667-87.

Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, Nakauchi H, Tojo A. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol* 2009; 90(2): 261-9.

Ito N, Huang K, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. *Cell Signal* 2001; 13(11): 849-54.

Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008; 132(4): 567-82.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745-56.

Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(5): 1906-9.

Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987; 18(3): 234-9.

Jeong JA, Hong SH, Gang EJ, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Han H, Kim H. Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray. *Stem Cells* 2005; 23(4): 584-93.

Jeschke MG, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Kita K. Umbilical cord lining membrane and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: the similarities and differences. *Open Tissue Eng Regen Med J* 2011, 4, 21-7.

Ji GZ, Wei X, Chen GQ. Growth of human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells on the terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate). *J Biomater Sci Polym Ed* 2009; 20(3): 325-39.

Jo CH, Kim OS, Park EY, Kim BJ, Lee JH, Kang SB, Lee JH, Han HS, Rhee SH, Yoon KS. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion. *Cell Tissue Res* 2008; 334(3): 423-33.

Jomura S, Uy M, Mitchell K, Dallsen R, Bode CJ, Xu Y. Potential treatment of cerebral global ischemia with Oct-4+ umbilical cord matrix cells. *Stem Cells* 2007; 25(1): 98-106.

Kadam SS, Tiwari S, Bhonde RR. Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; 45(1-2): 23-7.

Kadner A, Hoerstrup SP, Tracy J, Breymann C, Maurus CF, Melnitchouk S, Kadner G, Zund G, Turina M. Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann Thorac Surg* 2002; 74(4): S1422-8.

Kadner A, Zund G, Maurus C, Breymann C, Yakarisik S, Kadner G, Turina M, Hoerstrup SP. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25(4): 635-41.

Kaehler J, Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Kadletz M. Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg* 1989; 9(4): 535-41.

Kapfer X, Meichelboeck W, Groegler FM. Comparison of carbon-impregnated and standard ePTFE prostheses in extra-anatomical anterior tibial artery bypass: a prospective randomized multicenter study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 32(2): 155-68.

Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2007; 25(2): 319-31.

Karahuseyinoglu S, Kocafe C, Balci D, Erdemli E, Can A. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(3): 682-91.

Kershaw DB, Beck SG, Wharram BL, Wiggins JE, Goyal M, Thomas PE, Wiggins RC. Molecular cloning and characterization of human podocalyxin-like protein. Orthologous relationship to rabbit PCLP1 and rat podocalyxin. *J Biol Chem* 1997; 272(25): 15708-14.

Kermani AJ, Fathi F, Mowla SJ. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. *Rejuvenation Res* 2008; 11(2): 379-86.

Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int* 2008; 32(7): 724-32.

Khosla N, Ahya SN. Improving dialysis access management. *Semin Nephrol* 2002 Nov;22(6):507-14.

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci* 2002; 115: 2817-28.

Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004; 83(12): 733-8.

Kim JY, Jeon HB, Yang YS, Oh W, Chang JW. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. *World J Stem Cells* 2010; 2(2): 34-8.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266(5193): 2011-5.

Kinare A. Fetal environment. *Indian J Radiol Imaging* 2008; 18(4): 326-44.

Kirton JP, Tsai TN, Xu Q. Cells and vascular tissue engineering. En: *Stem Cell Engineering, Principles and Applications*. 1^a ed. Springer Science + Business Media Inc, NY, USA, 2011; pp. 261-95.

Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* 2009; 59(1): 31-44.

Kita K, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Jeschke MG. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev* 2010; 19(4): 491-502.

Kobayashi K, Kubota T, Aso T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin. *Early Hum Dev* 1998; 51(3): 223-33.

Kocafe C, Balci D, Hayta BB, Can A. Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair. *Stem Cell Rev* 2010; 6(4): 512-22.

Konuma T, Devaney EJ, Bove EL, Gelehrter S, Hirsch JC, Tavakkol Z, Ohye RG. Performance of CryoValve SG decellularized pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg* 2009; 88(3): 849-54.

Korossis SA, Bolland F, Kearney FJN, Fisher J, Ingham E. Bioreactors in tissue engineering. En: *Topics in Tissue Engineering*, vol. 2, 1ª ed. Expertissues, University of Oulu, Finland, 2005; pp: 2-23.

Krawiec JT, Vorp DA. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. *Biomaterials* 2012; 33(12): 3388-400.

Kwa AT, Yeo KK, Laird JR. The role of stent-grafts for prevention and treatment of restenosis. *J Cardiovasc Surg* 2010; 51(4): 579-89.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.

La Rocca G, Anzalone R, Farina F. The expression of CD68 in human umbilical cord mesenchymal stem cells: new evidences of presence in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 2009a; 70(2): 161-2.

La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasà L, Cappello F, Zummo G, Farina F. Isolation and characterization

of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* 2009b; 131(2): 267-82.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.

Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal* 2010; 8: 18.

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103(5): 1669-75.

Limaye V, Vadas M. The vascular endothelium: structure and function. En: *Mechanisms of Vascular Disease: A Textbook for Vascular Surgeons*, 1^a ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2007; pp: 1-10.

Liu Y, Chen KJ. Atherosclerosis, vascular aging and therapeutic strategies. *Chin J Integr Med* 2012; 18(2): 83-7.

Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38(4): 431-40.

Lösel-Sadée H, Alefelder C. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene graft for infragenicular bypass: five-year results. *J Cardiovasc Surg* 2009; 50(3): 339-43.

Loureiro RM, D'Amore PA. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(1): 77-89.

Lovell-Badge R. The future for stem cell research. *Nature* 2001; 414(6859): 88-91.

Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006; 91(8): 1017-26.

Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauvé Y, Messina DJ, Harris IR, Kihm AJ, Harmon AM, Chin FY, Gosiewska A, Mistry SK. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* 2007; 25(3): 602-11.

Lupu M, Khalil M, Andrei E, Iordache F, Pfannkuche K, Neef K, Georgescu A, Buzila C, Brockmeier K, Maniu H, Hescheler J. Integration properties of Wharton's jelly-derived novel mesenchymal stem cells into ventricular slices of murine hearts. *Cell Physiol Biochem* 2011; 28(1): 63-76.

Luscher TF, Tanner FC. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens* 1993; 6: 283S-93S.

Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997; 20: 3-10.

Ma L, Feng XY, Cui BL, Law F, Jiang XW, Yang LY, Xie QD, Huang TH. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118(23): 1987-93.

Madri JA, Dreyer B, Pitlick FA, Furthmayr H. The collagenous components of the subendothelium. Correlation of structure and function. *Lab Invest* 1980; 43: 303-15.

Majack RA, Goodman LV, Dixit VM. Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol* 1988; 106: 415-22.

Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal* 2009; 7: 6.

Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, Kasper C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2011; 7(1): 17-31.

Malkowski A, Sobolewski K, Jaworski S, Bankowski E. FGF binding by extracellular matrix components of Wharton's jelly. *Acta Biochim Pol* 2007; 54(2): 357-63.

Malkowski A, Sobolewski K, Jaworski S, Bańkowski E. TGF-beta binding in human Wharton's jelly. *Mol Cell Biochem* 2008; 311(1-2): 137-43.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; 86(10): 1099-100.

Marieb EN. *Essentials of Human Anatomy & Physiology*, 9^a ed. Pearson Education, Inc NJ, USA, 2009.

Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1992; 307(3): 287-93.

Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res* 2000; 256: 291-9.

Martin BM, Ritchie AR, Toselli P, Franzblau C. Elastin synthesis and accumulation in irradiated smooth muscle cell cultures. *Connect Tissue Res* 1992; 28: 181-9.

Martin ND, Schaner PJ, Tulenko TN, Shapiro IM, Dimatteo CA, Williams TK, Hager ES, DiMuzio PJ. In vivo behavior of decellularized vein allograft. *J Surg Res* 2005; 129(1): 17-23.

Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008; 3(1): 1-5.

Mason C, Brindley DA, Culme-Seymour EJ, Davie NL. Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential. *Regen Med* 2011; 6(3): 265-72.

Mathieu P, Roca V, Gamba C, Del Pozo A, Pitossi F. Neuroprotective effects of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in an immunocompetent animal model of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2012; 246(1-2): 43-50.

Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001; 2001(112): re21.

McCulloch AD, Harris AB, Sarraf CE, Eastwood M. New multi-cue bioreactor for tissue engineering of tubular cardiovascular samples under physiological conditions. *Tissue Eng* 2004; 10: 565-73.

McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH.. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans* 1991; 19(1): 29S.

Medicetty S, Bledsoe AR, Fahrenholtz CB, Troyer D, Weiss ML. Transplantation of pig stem cells into rat brain: proliferation during the first 8 weeks. *Exp Neurol* 2004; 190(1): 32-41.

Meinhart J, Deutsch M, Zilla P. Eight years of clinical endothelial cell transplantation. Closing the gap between prosthetic grafts and vein grafts. *ASAIO J* 1997; 43(5): M515-21.

Meyer K, Palmer JW. On glycoproteins: The polysaccharides of vitreous humor and of umbilical cord. *J. Biol. Chem* 1936 114: 689-703.

Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2006; 30(9): 681-7.

Michel CC. The transport of albumin: a critique of the vesicular system in transendothelial transport. *Am Rev Resp Dis* 1992; 146: 532-6.

Miglino MA, DiDio LJ. History of the anatomy of the funiculus umbilicalis in mammals. *Ital J Anat Embryol* 1992; 97(3): 171-6.

Mihu CM, Mihu D, Costin N, Rus Ciucă D, Suşman S, Ciorte R. Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord. *Rom J Morphol Embryol* 2008; 49(4): 441-6.

Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003; 21(1): 50-60.

Mitchell KE. Umbilical cord stem cells. En: *Contemporary Endocrinology: Stem Cells In Endocrinology*, 1ª ed. Humana Press Inc, Totowa, NY, USA, 2005; pp. 49-65.

Monahan TS, LoGerfo FW. Endothelialization of Prosthetic Vascular Grafts. En: *Endothelial Biomedicine*, 1ª ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2007; pp: 1501-5.

Moncada S, Gryglewsky R, Buting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263: 663-5.

Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *New Eng J Med* 1979; 300: 1142-7.

Montanucci P, Basta G, Pescara T, Pennoni I, Di Giovanni F, Calafiore R. New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(21-22): 2651-61.

Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, Lavrentieva A, Majore I, Hass R, Kasper C. Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2010; 123: 29-54.

Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989; 59(3): 521-9.

Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol* 2002; 72(3): 221-9.

Mumby SM, Abbott-Brown D, Raugi GJ, Bornstein P. Regulation of thrombospondin secretion by cells in culture. *J Cell Physiol* 1984; 120: 280-8.

Musina RA, Bekchanova ES, Belyavskii AV, Grinenko TS, Sukhikh GT. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med* 2007; 143(1): 127-31.

Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, Paszkowiak JJ, Westvik TS, Kudo FA, Nishibe T, Dardik A. Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. *J Vasc Surg* 2007; 45 Suppl. A: A15-24.

Naito Y, Shinoka T, Duncan D, Hibino N, Solomon D, Cleary M, Rathore A, Fein C, Church S, Breuer C. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(4-5): 312-23.

Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad Kazan H, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol* 2010a; 264(2): 171-9.

Nanaev AK, Kohlen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 1997; 18(1): 53-64.

Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro LV, Kovacs K, Lloyd RV. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* 2011; 31(6): 2283-90.

Nekanti U, Rao VB, Bahirvani AG, Jan M, Totey S, Ta M. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2010a; 19(1): 117-30.

Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *Int J Biol Sci* 2010b; 6(5): 499-512.

Nekanti U, Mohanty L, Venugopal P, Balasubramanian S, Totey S, Ta M. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res* 2010c; 5(3): 244-54.

Nieponice A, Soletti L, Guan J, Deasy BM, Huard J, Wagner WR, Vorp DA. Development of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique. *Biomaterials* 2008; 29(7): 825-33.

Niklason LE, Langer RS. Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transpl Immunol* 1997; 5:303-6.

Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284: 489-93.

Niklason LE, Ratcliffe A, Brockbank K, Bruley DF, Kang KA. Bioreactors and bioprocessing: breakout session summary. *Ann NY Acad Sci* 2002; 961: 220-2.

Ninagawa N, Murakami R, Isobe E, Tanaka Y, Nakagawa H, Torihashi S. Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits. *Differentiation* 2011; 82(3): 153-64.

Niu S, Matsuda T, Oka T. Control of cellular orientation in two-dimensional tissue formation. Surface topologic effect of collagen fibers on endothelialization. *ASAIO Trans* 1991; 37(3): M441-2.

Noishiki Y, Marat D, Yamane Y, Satoh S, Ma XH, Iwai Y, Mo M, Matsumoto A. A collagen coated fabric vascular prosthesis as a puncturable A-V shunt. *ASAIO J* 1996; 42(5): M687-93.

Norton L, Eiseman B. Replacement of portal vein during pancreatectomy for carcinoma. *Surgery* 1975; 77: 280-4.

Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 1988; 54(7): 993-1001.

Oliviero O, Ventre M, Netti PA. Functional porous hydrogels to study angiogenesis under the effect of controlled release of vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater* 2012. PMID: 22641106

Ortenwall P, Wadenvick H, Kutti J, Risberg B. Reduction in deposition of indium 111-labelled platelets after autologous endothelial cell seeding of Dacron aortic bifurcation grafts in humans: A preliminary report. *J Vasc Surg* 1987; 6: 17-25.

Ortenwall P, Wadenvick H, Risberg B. Reduced platelet deposition on seeded versus unseeded segments of expanded polytetrafluoroethylene grafts: Clinical observations after 6-month follow-up. *J Vasc Surg* 1989; 10:374-80.

Ortenwall P, Wadenvick H, Kutti J, Risberg B. Endothelial cell seeding reduces thrombogenicity of Dacron grafts in humans. *J Vasc Surg* 1990; 11: 403-10.

Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. *Micron* 2001; 32: 251-60.

Pancrazio JJ, Wang F, Kelley CA. Enabling tools for tissue engineering. *Biosens Bioelectron* 2007; 22(12): 2803-11.

Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, Zago MA. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22(7): 1263-78.

Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med* 2009; 4(3): 423-33.

Parry EW. Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord. *J Anat* 1970; 107(Pt 3): 505-18.

Pascual G, Escudero C, Rodríguez M, Corrales C, Serrano N, Bellón JM, Buján J. Restoring the endothelium of cryopreserved arterial grafts: co-culture of venous and arterial endothelial cells. *Cryobiology* 2004a; 49(3): 272-85.

Pascual G, Martínez S, García-Honduvilla N, Corrales C, Bellón JM, Buján J. Long-term behaviour of cryopreserved arterial grafts versus prosthetic micrografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004b; 27(4): 423-31.

Pascual G, Martínez S, Rodríguez M, Serrano N, Bellón JM, Buján J. Patency and structural changes in cryopreserved arterial grafts used as vessel substitutes in the rat. *J Surg Res* 2005; 124(2): 297-304.

Pascual G, Mendieta C, García-Honduvilla N, Corrales C, Bellón JM, Buján J. TGF-beta1 upregulation in the aging varicose vein. *J Vasc Res* 2007; 44(3): 192-201.

Passeri S, Nocchi F, Lamanna R, Lapi S, Miragliotta V, Giannessi E, Abramo F, Stornelli MR, Matarazzo M, Plenteda D, Urciuoli P, Scatena F, Coli A. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Int* 2009; 33(1): 100-5.

Pasterkamp G, Schoneveld AH, van der Wal AC, Haudenschild CC, Clarijs RJ, Becker AE, Hillen B, Borst C. Relation of arterial geometry to luminal narrowing and histologic markers for plaque vulnerability: the remodeling paradox. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 655-62.

Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res* 2004; 301(1): 1-7.

Pawlowski KJ, Rittgers SE, Schmidt SP, Bowlin GL. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci* 2004 May 1;9:1412-21.

Peng J, Wang Y, Zhang L, Zhao B, Zhao Z, Chen J, Guo Q, Liu S, Sui X, Xu W, Lu S. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Res Bull* 2011; 84(3): 235-43.

Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, Ghosh K. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2(7): 394-9.

Petsa A, Gargani S, Felesakis A, Grigoriadis N, Grigoriadis I. Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton's Jelly stem cells in large-scale applications. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; 45(10): 573-6.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 25(11): 2896-902.

Placzek MR, Chung IM, Macedo HM, Ismail S, Mortera Blanco T, Lim M, Cha JM, Fauzi I, Kang Y, Yeo DC, Ma CY, Polak JM, Panoskaltsis N, Mantalaris A. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J R Soc Interface* 2009; 6(32): 209-32.

Pober JS, Orosz CG, Rose ML, Savage CO. Can graft endothelial cells initiate a host antigraft immune response?. *Transplantation* 1996; 61: 343-9.

Poblete R. *Patología Arterial y Venosa*, 1ª ed. Sociedad de Cirujanos de Chile, Santiago de Chile, Chile, 1994; pp: 609-20.

Polak JM, Mantalaris S. Stem cells bioprocessing: an important milestone to move regenerative medicine research into the clinical arena. *Pediatr Res* 2008; 63(5): 461-6.

Polykandriotis E, Arkudas A, Beier JP, Dragu A, Rath S, Prymachuk G, Schmidt VJ, Lametschwandtner A, Horch RE, Kneser U. The impact of VEGF and bFGF on vascular stereomorphology in the context of angiogenic neo-arborisation after vascular induction. *J Electron Microsc* 2011; 60(4): 267-74.

Poole-Warren LA, Schindhelm K, Graham AR, Slowiaczek PR, Noble KR. Performance of small diameter synthetic vascular prostheses with confluent autologous endothelial cell linings. *J Biomed Mater Res* 1996; 30(2): 221-29.

Pörtner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(3): 235-45.

Prager M, Polterauer P, Böhmig HJ, Wagner O, Fügl A, Kretschmer G, Plohner M, Nanobashvili J, Huk I. Collagen versus gelatin-coated Dacron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery: results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial. *Surgery* 2001; 130(3): 408-14.

Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* 2010; 5(2): e9016.

Pries AR, Kuebler M. Normal Endothelium. En: *The Vascular Endothelium* 1^a ed. Springer Science + Business Media Inc, NY, USA, 2006; pp. 1-40.

Pronk A, Hoyneck van Papendrecht AA, Leguit P, Verbrugh HA, Verkooyen RP, van Vroonhoven TJ. Mesothelial cell adherence to vascular prostheses and their subsequent growth in vitro. *Cell Transplant* 1994; 3(1): 41-8.

Prósper F, Verfaillie CM. Adult stem cells. *An Sist Sanit Navar* 2003; 26: 345-56.

Prósper F, Gavira JJ, Herreros J, Rábago G, Luquin R, Moreno J, Robles JE, Redondo P. Cell transplant and regenerative therapy with stem cells. *An Sist Sanit Navar* 2006; 29(2): 219-34.

Puri KD, Finger EB, Gaudernack G, Springer TA. Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J Cell Biol* 1995; 131(1): 261-70.

Qiao C, Xu W, Zhu W, Hu J, Qian H, Yin Q, Jiang R, Yan Y, Mao F, Yang H, Wang X, Chen Y. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int* 2008; 32(1): 8-15.

Quint C, Arief M, Muto A, Dardik A, Niklason LE. Allogeneic human tissue-engineered blood vessel. *J Vasc Surg* 2012; 55(3): 790-8.

Rademacher A, Paulitschke M, Meyer R, Hetzer R. Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes. *Int J Artif Organs* 2001; 24: 235-42.

Randone B, Cavallaro G, Polistena A, Cucina A, Coluccia P, Graziano P, Cavallaro A. Dual role of VEGF in pretreated experimental ePTFE arterial grafts. *J Surg Res* 2005; 127(2): 70-9.

Ranjan AK, Kumar U, Hardikar AA, Poddar P, Nair PD, Hardikar AA. Human blood vessel-derived endothelial progenitors for endothelialization of small diameter vascular prosthesis. *PLoS One* 2009; 4(11): e7718.

Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 2006; 20(8): 1045-54.

Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 24731-7.

Rodríguez M, Pascual G, Cifuentes A, Pérez-Köhler B, Bellón JM, Buján J. Role of lysyl oxidases in neointima development in vascular allografts. *J Vasc Res* 2011; 48(1): 43-51.

Rodríguez M, Pascual G, Pérez-Köhler B, Cifuentes A, García-Honduvilla N, Bellón JM, Buján J. Immune response to the long-term grafting of cryopreserved small-diameter arterial allografts. *Histol Histopathol* 2012; 27: 873-84.

Rodríguez-Morata A, Garzón I, Alaminos M, García-Honduvilla N, Sánchez-Quevedo MC, Buján J, Campos A. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg* 2008; 22(3):440-8.

Roll S, Müller-Nordhorn J, Keil T, Scholz H, Eidt D, Greiner W, Willich SN. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery--systematic review and meta-analysis. *BMC Surg* 2008; 8:22.

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21(1): 105-10.

Romanowicz L, Galewska Z, Gogiel T, Jaworski S, Sobolewski K. Fatty acid composition of triacylglycerols from Wharton's jelly determined by high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2008; 70(6): 973-7.

Romanowicz L, Bankowski E. Lipid compounds of human Wharton's jelly and their alterations in preeclampsia. *Int J Exp Pathol* 2010; 91(1): 1-9.

Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int* 2003; 72(2): 135-42.

Rosenkranz B, Fischer C, Reimann I, Weimer KE, Beck G, Frölich JC. Metabolism of prostacyclin and 6-keto-prostaglandin F1 alpha in man. *Artery* 1980; 8(1): 18-22.

Rosenman JE, Kempczinski RF, Pearce WH, Silberstein EB. Kinetics of endothelial cell seeding. *J Vasc Surg* 1985; 2(6): 778-84.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.

Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 2010; 28(4): 788-98.

Ryynänen J, Tan EM, Hoffren J, Woodley DT, Sollberg S. Type VII collagen gene expression in human umbilical tissue and cells. *Lab Invest* 1993; 69(3): 300-4.

Sadler TW. Third Month to Birth: The Fetus and Placenta. En: *Langman's Medical Embryology* 10^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA, 2006; pp. 91-112.

Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A, Carson RJ. The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomat App* 2001; 15(3): 241-78.

Sánchez Crespo A, Hallberg J, Lundberg JO, Lindahl SG, Jacobsson H, Weitzberg E, Nyrén S. Nasal nitric oxide and regulation of human pulmonary blood flow in the upright position. *J Appl Physiol* 2010; 108(1): 181-8.

Sander M, Hansen P, Victor R. Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. *Hypertension* 1995; 26: 691-5.

Sanmano B, Mizoguchi M, Suga Y, Ikeda S, Ogawa H. Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: in an attempt to improve reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. *J Dermatol Sci* 2005; 37(1): 29-39.

Sanz-Rodríguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabéu C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* 2004; 279(31): 32858-68.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005; 23(2): 220-9.

Sarugaser R, Ennis J, Stanford WL, Davies JE. Isolation, propagation, and characterization of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods Mol Biol.* 2009;482: 269-79.

Scharn DM, Daamen WF, van Kuppevelt TH, van der Vliet JA. Biological mechanisms influencing prosthetic bypass graft patency: possible targets for modern graft design. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012; 43(1): 66-72.

Schmidt SP, Bowlin GL. Endothelial cell seeding: a review. En: *Tissue Engineering of Vascular Prosthetic Grafts*, 1ª ed. R.G. Landes Company, TX, USA, 1999; pp. 61-8.

Schmidt D, Asmis LM, Odermatt B, Kelm J, Breymann C, Gössi M, Genoni M, Zund G, Hoerstrup SP. Engineered living blood vessels: functional endothelia generated from human umbilical cord-derived progenitors. *Ann Thorac Surg* 2006; 82(4): 1465-71.

Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, Pérez-Bouza A, Neuss S. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* 2010a; 31(3): 467-80.

Schneider RK, Püllen A, Kramann R, Bornemann J, Knüchel R, Neuss S, Perez-Bouza A. Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. *Differentiation* 2010b; 79(3): 182-93.

Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, Schmidt BT, Askew Y, Nance JJ, Evron JM, Peault B, Deasy BM. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 789526.

Scow RO, Blanchette-Mackie EJ, Smith IC. Role of the capillary endothelium in the clearance of chylomicrons: a model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes. *Circ Res* 1976; 39: 149-62.

Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells* 2008; 26(1): 146-50.

Seliktar D, Black RA, Vito RP, Nerem RM. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann Biomed Eng* 2000; 28: 351-62.

Sell S. Stem cells: What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they going? En: *Stem Cells Handbook*, 1^a ed. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA, 2004; pp. 1-18.

Semb H, Christofori G. The tumor-suppressor function of E-cadherin. *Am J Hum Genet* 1998; 63(6): 1588-93.

Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. *Methods Cell Biol* 2008; 86: 101-19.

Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion JD, Zalewski A. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation* 1996; 93: 340-8.

Shi Y, O'Brien JE Jr, Ala-Kokko L, Chung W, Mannion JD, Zalewski A. Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation* 1997; 95: 997-1006.

Short M, Nemenoff RA, Zawada WM, Stenmark KR, Das M. Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C416-25.

Simionescu M, Ghitescu L, Fixman A, Simionescu N. How plasma macromolecules cross the endothelium. *New Physiol Sci* 1987; 2: 135-8.

Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 23(6): 1002-6.

Smyth JV, Welch M, Carr HM, Dodd PD, Eisenberg PR, Walker MG. Fibrinolysis profiles and platelet activation after endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts. *Ann Vasc Surg* 1995; 9(6): 542-6.

Sobolewski K, Malkowski A, Bańkowski E, Jaworski S. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta* 2005; 26(10): 747-52.

Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Potapov EV, Hausmann H, Hetzer R. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue Eng* 2002; 8: 863-70.

Song Y, Feijen J, Grijpma DW, Poot AA. Tissue engineering of small-diameter vascular grafts: a literature review. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011; 49(1-4): 357-74.

Speert H. Obstetric-gynecologic eponyms; Thomas Wharton and the jelly of the umbilical cord. *Obstet Gynecol* 1956; 8(3): 380-2.

Sreerekha PR, Krishnan LK. Cultivation of endothelial progenitor cells on fibrin matrix and layering on dacron/polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Artif Organs* 2006; 30(4): 242-9.

Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology* 2006; 21:134 -45.

Sterpetti AV, Lepidi S, Cucino A, Patrizi AL, Palumbo R, Taranta A, Stipa F, Cavallaro A, Santoro-D'Angelo L, Stipa S. Growth factor production after polytetrafluoroethylene and vein arterial grafting: an experimental study. *J Vasc Surg* 1996; 23(3): 452-60.

Stitzel J, Liu J, Lee SJ, Komura M, Berry J, Soker S, Lim G, Van Dyke M, Czerw R, Yoo JJ, Atala A. Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials* 2006; 27(7): 1088-94.

Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34(12): 1508-12.

Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 2007; 128: 747-62.

Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta* 2011; 32 Suppl 4: S311-5.

Takechi K, Kuwabara Y, Mizuno M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta* 1993; 14(2): 235-45

Tavian M, Zheng B, Oberlin E, Crisan M, Sun B Huard J, Peault B. The vascular wall as a source of stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1044: 41-50.

Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23(6): 475-85.

Thomson GJ, Vohra R, Walker MG. Cell seeding for small diameter ePTFE vascular grafts: a comparison between adult human endothelial and mesothelial cells. *Ann Vasc Surg* 1989; 3(2): 140-5.

Thomson GJ, Vohra RK, Carr MH, Walker MG. Adult human endothelial cell seeding using expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts: a comparison of four substrates. *Surgery* 1991; 109(1): 20-7.

Thyberg J, Blomgren K, Roy J, Tran PK, Hedin U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 837-46.

Tisato V, Cozzi E. Xenotransplantation: an overview of the field. *Methods Mol Biol* 2012; 885: 1-16.

Tordoir JH, Van Der Sande FM, De Haan MW. Current topics on vascular access for hemodialysis. *Minerva Urol Nefrol* 2004; 56(3): 223-35.

Tosun Z, Villegas-Montoya C, McFetridge PS. The influence of early-phase remodeling events on the biomechanical properties of engineered vascular tissues. *J Vasc Surg* 2011; 54(5): 1451-60.

Travis AJ, Kim Y, Meyers-Wallen V. Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. *Reprod Dom Anim* 2009; 44: 22-8.

Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008; 26(3): 591-9.

Udelsman B, Hibino N, Villalona GA, McGillicuddy E, Nieponice A, Sakamoto Y, Matsuda S, Vorp DA, Shinoka T, Breuer CK. Development of an operator-independent method for seeding tissue-engineered vascular grafts. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; 17(7): 731-6.

Unterluggauer H, Mazurek S, Lener B, Hütter E, Eigenbrodt E, Zwerschke W, Jansen-Dürr P. Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase. *Biogerontology* 2008; 9(4): 247-59.

Valiyaveetil M, Achur RN, Muthusamy A, Gowda DC. Characterization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoglycans of extracellular matrices of human umbilical cord blood vessels and Wharton's jelly. *Glycoconjugate J* 2004; 21(6): 361-75.

Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991; 5:2814-23.

Vara DS, Punshon G, Sales KM, Sarkar S, Hamilton G, Seifalian AM. Endothelial cell retention on a viscoelastic nanocomposite vascular conduit is improved by exposure to shear stress preconditioning prior to physiological flow. *Artif Organs* 2008; 32(12): 977-81.

Vara DS, Punshon G, Sales KM, Hamilton G, Seifalian AM. Haemodynamic regulation of gene expression in vascular tissue engineering. *Curr Vasc Pharmacol* 2011; 9(2): 167-87.

Varnava AM, Mills PG, Davies MJ. Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability. *Circulation* 2002; 105: 939-43.

Vassalotti JA. Arteriovenous fistula stenosis: new terminology. *Semin Dial* 2004; 17(3): 243.

Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. *Hematology* 2002, 1: 369-91.

Verhagen HJ, Blankensteijn JD, de Groot PG, Heijnen-Snyder GJ, Pronk A, Vroom TM, Muller HJ, Nicolay K, van Vroonhoven TJ, Sixma JJ, Eikelboom BC. In vivo experiments with mesothelial cell seeded ePTFE vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998; 15(6): 489-96.

Vohra R, Thomson GJ, Carr HM, Sharma H, Walker MG. The response of rapidly formed adult human endothelial-cell monolayers to shear stress of flow: a comparison of fibronectin-coated Teflon and gelatin-impregnated Dacron grafts. *Surgery* 1992; 111(2): 210-20.

Voorhees AB Jr, Jaretzki A 3rd, Blakemore AH. The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. *Ann Surg* 1952; 135(3): 332-6.

Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 1982; 95(1): 355-60.

Walker MG, Thomson GJ, Shaw JW. Endothelial cell seeded versus non-seeded ePTFE grafts in patients with severe peripheral vascular disease. En: *Endothelialization of Vascular Grafts*. 1^a ed. S Karger AG, Basel, Switzerland, 1987; pp: 245-8.

Walles T, Puschmann C, Haverich A, Mertsching H. Acellular scaffold implantation. No alternative to tissue engineering. *Int J Artif Organs* 2003; 26(3): 225-34.

Wang D, Chen K, Du WT, Han ZB, Ren H, Chi Y, Yang SG, Bayard F, Zhu D, Han ZC. CD14⁺ monocytes promote the immunosuppressive effect of human umbilical cord matrix stem cells. *Exp Cell Res* 2010; 316(15): 2414-23.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22(7): 1330-7.

Wang HW, Lin LM, He HY, You F, Li WZ, Huang TH, Ma GX, Ma L. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124(10): 1534-9.

Wang L, Dormer NH, Bonewald LF, Detamore MS. Osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in polyglycolic acid scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(6): 1937-48.

Wang L, Ott L, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Regen Med* 2011; 6(1): 95-109.

Wang SH, Lin SJ, Chen YH, Lin FY, Shih JC, Wu CC, Wu HL, Chen YL. Late outgrowth endothelial cells derived from Wharton jelly in human umbilical cord reduce neointimal formation after vascular injury: involvement of pigment epithelium-derived factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(6): 816-22.

Weber B, Zeisberger SM, Hoerstrup SP. Prenatally harvested cells for cardiovascular tissue engineering: fabrication of autologous implants prior to birth. *Placenta* 2011; 32 Suppl 4: S316-9.

Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986; 231(4736): 397-400.

Weismann IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments and transdifferentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 387-403.

Weiss ML, Mitchell KE, Hix JE, Medicetty S, El-Zarkouny SZ, Grieger D, Troyer DL. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol* 2003; 182(2): 288-99.

Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G, Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006; 24(3): 781-92.

Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2006; 2(2): 155-62.

Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, Troyer D, McIntosh KR. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 2008; 26(11): 2865-74.

Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121(2): 368-74.

Wharton T. *Adenographia* 1656. Traducido del latín por Stephen Freer. Oxford University Press, NY, USA, 1996.

Wight TN, Kinsella MG, Qwarnstrom EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4: 793-801.

Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister JH. Gray's Anatomy, 36^a ed. Salvat Editores SA, Mallorca, Spain, 1985.

Williams C, Wick TM. Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries. *Tissue Eng* 2004; 10: 930-41.

Witkowska-Zimny M, Wrobel E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell Mol Biol Lett* 2011; 16(3): 493-514.

Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, Gu DS, Han ZC, Liu YL. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* 2007; 100(3): 608-16.

Wu KH, Mo XM, Zhou B, Lu SH, Yang SG, Liu YL, Han ZC. Cardiac potential of stem cells from whole human umbilical cord tissue. *J Cell Biochem* 2009; 107(5): 926-32.

Wu LF, Wang NN, Liu YS, Wei X. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(10): 2865-73.

Xiao L, Shi D. Role of precoating in artificial vessel endothelialization. *Chin J Traumatol* 2004; 7(5): 312-6.

Xu HH, Zhao L, Detamore MS, Takagi S, Chow LC. Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(9): 2743-53.

Xu Y, Meng H, Li C, Hao M, Wang Y, Yu Z, Li Q, Han J, Zhai Q, Qiu L. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can

differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization. *Stem Cells Dev* 2010; 19(10): 1511-22.

Xu W, Zhou F, Ouyang C, Ye W, Yao M, Xu B. Mechanical properties of small-diameter polyurethane vascular grafts reinforced by weft-knitted tubular fabric. *J Biomed Mater Res A* 2010; 92(1): 1-8.

Yang X, Zhang M, Zhang Y, Li W, Yang B. Mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly of the human umbilical cord ameliorate damage to human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2011; 96(4): 1029-36.

Yarygin KN, Suzdal'tseva YG, Burunova VV, Voronov AV, Petrakova NV, Cheglakov IB, Stupin VA, Yarygin VN. Comparative study of adult human skin fibroblasts and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med* 2006; 141(1): 161-6.

Yazdani SK, Tillman BW, Berry JL, Soker S, Geary RL. The fate of an endothelium layer after preconditioning. *J Vasc Surg* 2010; 51(1): 174-83.

Yeo KK, Rogers JH, Laird JR. Use of stent grafts and coils in vessel rupture and perforation. *J Interv Cardiol* 2008; 21(1):86-99.

Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, Sung KW, Kim CW, Koo HH. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 2009; 259(2): 150-6.

Yu H, Dai W, Yang Z, Kirkman P, Weaver FA, Eton D, Rowe VL. Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. *J Vasc Surg* 2003; 38(3): 557-63.

Zalewski A, Shi Y. Vascular myofibroblasts. Lessons from coronary repair and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:417-22.

Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, Malaise MG, Gothot A, Lechanteur C, Beguin Y. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int* 2010; 34(7): 693-701.

Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell Mol Med* 2007; 11(5): 945-57.

Zhu A, Zhao F, Ma T. Photo-initiated grafting of gelatin/N-maleic acyl-chitosan to enhance endothelial cell adhesion, proliferation and function on PLA surface. *Acta Biomater* 2009; 5(6): 2033-44.

Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Fischlein T, Minar E, Hammerle A, Krupicka O, Kadletz M. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg* 1987; 6(6): 535-41.

Zilla P, Preiss P, Groscurth P, Rösemeier F, Deutsch M, Odell J, Heidinger C, Fasol R, von Oppell U. In vitro-lined endothelium: initial integrity and ultrastructural events. *Surgery* 1994; 116(3): 524-34.

Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 2007; 28(34): 5009-27.

Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 2003; 17(6): 1146-9.

Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P, Nagano M. CD9 Is Expressed on Human Male Germ Cells That Have a Long-Term Repopulation Potential after Transplantation into Mouse Testes. *Biol Reprod* 2012. PMID: 22592495.

Zucconi E, Vieira NM, Bueno DF, Secco M, Jazedje T, Ambrosio CE, Passos-Bueno MR, Miglino MA, Zatz M. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein--a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells Dev* 2010; 19(3): 395-402.

Zucconi E, Vieira NM, Bueno CR Jr, Secco M, Jazedje T, Costa Valadares M, Fussae Suzuki M, Bartolini P, Vainzof M, Zatz M. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 715251. PMID: 21785565.

Capítulo 8

Anexos

8. ANEXOS

La presente Memoria de Tesis Doctoral ha podido ser realizada gracias a las siguientes financiaciones:

- Ayuda FIS (Fondo de Investigación Sanitaria) del Instituto de Salud Carlos III. Proyecto con título “Identificación de patrones (gold standard) de viabilidad y estabilidad de células endoteliales diferenciadas y endoteliales derivadas de células madre mesenquimales para su aplicación en bioterapia e Ingeniería Tisular” (subproyecto 1, PI-06/1784).
- Ayuda para la realización de proyectos para potenciar la creación y consolidación de grupos de investigación, CAM-UAH. Proyecto con título “Utilización de células mesenquimales de la gelatina de Wharton como terapia celular encaminada a la mejora de la reparación arterial” (CCG10-UAH/BIO-5973).
- Ayuda FPI-UAH para la formación de personal investigador (2009-2012).

Gracias a estas financiaciones, hemos podido publicar dos trabajos en revistas científicas de alto factor de impacto:

- Alaminos M, Pérez-Köhler B, Garzón I, García-Honduvilla N, Romero B, Campos A, Buján J. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 2010; 223(3): 640-7.
- Garzón I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martín-Piedra MA, García-Honduvilla N, Buján J, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(6): 408-1.

Transdifferentiation Potentiality of Human Wharton's Jelly Stem Cells Towards Vascular Endothelial Cells

MIGUEL ALAMINOS,¹ BÁRBARA PÉREZ-KÖHLER,² INGRID GARZÓN,¹
NATALIO GARCÍA-HONDUVILLA,² BEATRIZ ROMERO,² ANTONIO CAMPOS,¹
AND JULIA BUJÁN^{2*}

¹Department of Histology (Tissue Engineering Group), University of Granada, Granada, Spain

²Department of Medical Specialities, University of Alcalá, and Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain

Human Wharton's jelly stem cells (HWJSC) emerged as a potential source of viable cells for use in tissue engineering. In this work, we have analyzed the transdifferentiation capabilities of HWJSC towards transdifferentiated endothelial-like cells (Tr-ELC) in order to establish the potential usefulness of these cells in vascular tissue engineering. Our results show that Tr-ELC became more polygonal and less proliferative than HWJSC, resembling the structure and proliferation rate of the endothelial cells. In addition, the markers of mesenchymal undifferentiation CD9, E-cad, PODXL, and SSEA-4 are downregulated in Tr-ELC, suggesting that these cells can be in the process of adult differentiation. Besides, RT-PCR and microarray analyses revealed that some genes with a role in defining the endothelial phenotype and structure are upregulated (VEGF-R1, EDFl, AAMP, CD31, CD34, CDH5, and ICAM2) or downregulated (VEGF) in Tr-ELC, although a number of genes related to relevant endothelial cell functions (CD36, ECE2, VWF, THBD, PGI2, ECE1, and ACE) did not change or were only partially induced. All this implies that HWJSC are able to efficiently transdifferentiate towards Tr-ELC at the phenotypical level following a hierarchical pattern of gene activation, with an earlier induction of morphological and phenotypical genes.

J. Cell. Physiol. 223: 640–647, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Tissue engineering is an emerging area of medical research which is focused on the creation of artificial tissues to be used as therapeutic tools (Alaminos et al., 2007a). Construction of efficient substitutes of human tissues is strongly dependent on the availability of an adequate source of viable and functional cells (Alaminos et al., 2007b). Usually, mature or stem cells used in tissue engineering are isolated from adult tissue biopsies or from the human umbilical cord, this latter being one of the major sources of human undifferentiated mesenchymal stem cells (Wu et al., 2007b) with high differentiation potentiality (Weiss and Troyer, 2006).

On the other hand, the search for new vessel substitutes to replace blood vessels is an ongoing concern in cardiovascular surgery (García-Honduvilla et al., 2008). So far, tissue engineering applied to cardiovascular surgery has developed different models of vascular substitutes aiming to improve graft quality (Lanni et al., 2001; Mitchell and Niklason, 2003; L'Heureux et al., 2007; Wu et al., 2007a), and engineered arterial grafts increasingly resemble natural vessels with the use of endothelial cells seeded in appropriate scaffolds (Thomas et al., 2003; Amiel et al., 2006; Williamson et al., 2006; Rodríguez-Morata et al., 2008). Although endothelial cells have demonstrated to be a useful source of viable cells, a high cell viability is only maintained in culture for a few number of cell passages, given that mature endothelial cells have limited proliferative capacities (Wu et al., 2007b; Rodríguez-Morata et al., 2008). Therefore, the search of new sources of human cells with higher survival capacity to be used in cardiovascular tissue engineering is one of the main challenges in this field (Wu et al., 2007b). In this context, several types of stem cells can be used as cell sources for therapeutic angiogenesis, including the vascularization of engineered tissue grafts (Shen et al., 2003; Schmidt et al., 2004; Cao et al., 2005).

Several types of stem cells can be isolated from the human umbilical cord, all of them having high proliferation and differentiation capabilities (Weiss and Troyer, 2006). Particularly, the two main types of stem cells that have been isolated so far from the human umbilical cord are the hematopoietic progenitor cells of the blood vessels (Ye et al., 1994) and the human Wharton's jelly mesenchymal stem cells (HWJSC) (McElreavey et al., 1991; Troyer and Weiss, 2008). All these cell types have high telomerase activity (Mitchell and Niklason, 2003) and low expression of class I and II major histocompatibility complex antigens (Sarugaser et al., 2005; Lupatov et al., 2006; Lund et al., 2007; Wu et al., 2007b), what makes them potentially useful for use in clinical protocols of tissue engineering and cryopreservation in tissue banks for delayed autologous or allogeneic use.

M. Alaminos and B. Pérez-Köhler contributed equally to this work.

No competing financial interests exist for any of the authors.

Contract grant sponsor: Spanish Plan Nacional de Investigación Científica.

Contract grant sponsor: National Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III);

Contract grant numbers: FIS 06/1784, FIS 06/1781.

*Correspondence to: J. Buján, Faculty of Medicine, Department of Medical Specialities, University of Alcalá, Campus Universitario, Ctra. Madrid-Barcelona, Km.33.600, Alcalá de Henares, Madrid, Spain. E-mail: mjulia.bujan@uah.es

Received 26 August 2009; Accepted 14 December 2009

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com.), 8 February 2010.
DOI: 10.1002/jcp.22062

A number of works have recently focused on the use of stem cells for the generation of artificial vascular grafts by tissue engineering (Kim and von Recum, 2008), including hematopoietic, adipose (Planat-Benard et al., 2004), and mesothelial stem cells (Bujan et al., 2004), for example. Among them, HWJSC emerged as a potential source of viable cells in tissue engineering, and different authors have successfully transdifferentiated these cells into several types of adult mesenchymal cells *in vitro*, including, among others, chondroblasts, osteoblasts, and adipocytes (Wang et al., 2004; Sarugaser et al., 2005; Conconi et al., 2006). However, the usefulness of HWJSC as a source of endothelial cells in vascular tissue engineering has not been properly assessed. Only Wu et al. (2007b) recently demonstrated that these cells are able to generate transdifferentiated endothelial-like cells (Tr-ELC) under appropriate culture conditions.

In the present study, we investigated the transdifferentiation capabilities of HWJSC into ELC and we evaluated the genetic and protein expression of several differentiation markers in the Tr-ELC in order to establish the potential usefulness of these cells in vascular tissue engineering.

Materials and Methods

Establishment of primary cultures of human Wharton's jelly stem cells (HWJSC), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and transdifferentiated endothelial-like cells (Tr-ELC)

Human umbilical cords were obtained at the University Hospital Principe de Asturias (Alcalá de Henares, Madrid, Spain) and preserved in minimal essential medium (MEM; Gibco-BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA) at 4°C until the moment of use. To obtain endothelial cells from the human umbilical vein (HUVEC), we used the method of Jaffe et al. (1973). Briefly, a 0.1% collagenase I solution was instilled into the umbilical vein of the umbilical cord for 15 min at 37°C, and the detached cells were obtained by centrifugation. The culture medium used for the HUVEC cells was Medium 199 plus (Gibco-BRL/Invitrogen) supplemented with 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2 mM/L of L-glutamine, 1.5% of antibiotic-antimycotic solution and 1.5% of human platelet-derived endothelial cell growth factor (ECGF) (Sigma-Aldrich). Then, to isolate the Wharton's jelly, both the blood vessels and the amniotic epithelium were dissected and discarded from the umbilical cord, and the remaining tissue was subsequently fragmented into small explants and digested in 0.1% collagenase I (Gibco-BRL/Invitrogen) at 37°C for 4 h. Isolated HWJSC were harvested by centrifugation and cultured in Amniomax culture medium (Gibco-BRL/Invitrogen). Both HUVEC and HWJSC were seeded in duplicate using 25 cm² culture flasks.

After 4 days in culture HWJSC reached a subconfluent state (about 8×10^5 cells per flask). At this point, one flask of HWJSC from each sample was used to induce the transdifferentiation of the cells to the endothelial phenotype (Tr-ELC) by removing the Amniomax medium from the flasks and replacing it for the enriched M199 medium. The rest of the samples were maintained using Amniomax medium.

Induced HWJSC were cultured with enriched M199 medium for 4 days before the realization of all experiments. The same period of time was applied to HUVEC and non-induced HWJSC.

All cell cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂ atmosphere and the culture medium was changed once every 3 days. All cells used in this work belonged to the first cell subculture. This work was approved by the local research and ethical committees, and all patients included in the study provided informed consent for the use of the umbilical cords.

Phenotypical analysis of HWJSC and Tr-ELC

For the *in vivo* analysis of the cell cultures used in this work, we used a contrast light microscope. For scanning electron

microscopy (SEM), cells were subcultured on 12 mm diameter round glass coverslips and fixed in 2.5% glutaraldehyde. To determine the average size of the different cell cultures, we measured the length (major cell diameter) and width (minor cell diameter) of 50 cells of each sample.

Cell proliferation analysis

To determine the proliferation rate of the cells used in this work, HWJSC and Tr-ELC cells were seeded in 22 mm diameter wells of 12-well plates (8,000 cells/cm²) and cultured in Amniomax or M199 culture media, respectively. Culture media were changed every day. Then, one well corresponding to HWJSC and one well with Tr-ELC were trypsinized each 24 h, stained with trypan blue and the cells counted in the light microscope using a Neubauer chamber, until day 10th of culture. These experiments were carried out using five different samples obtained from five different human donors of each HWJSC and Tr-ELC groups, and each assay was carried out in triplicate. The average and standard deviation were calculated for each cell type and each time point.

To identify statistical differences between induced and non-induced cells, the non-parametric test of Wilcoxon for related samples was used, and a *P*-value <0.05 was considered statistically significant. To carry out the statistical analysis, we used SPSS 15.0 software.

Immunofluorescence expression analysis for markers of cell undifferentiation

When primary culture cells reached the subconfluent state, HWJSC and Tr-ELC were cultured in both Amniomax and M199 media, respectively, for 4 days. After that, cells were trypsinized and they were seeded in 12 mm diameter round glass coverslips at the number of 30,000 cells per coverslip, and they were maintained in the humidified incubator for 24 h prior to be fixed in 4% paraformaldehyde.

For the immunofluorescence assays, cells were washed in PBS and prehybridized for 30 min with 3% BSA at room temperature (Sigma-Aldrich). Then, a 1:10 dilution of mouse anti-CD9, E-cad, PODXL, and SSEA4 primary antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN) was used at 4°C overnight, cells were washed with PBS and incubated in a 1:100 solution of goat antimouse FITC-labeled secondary antibody (Sigma-Aldrich) at 37°C for 1 h. After washing in PBS, cell nuclei were counterstained with 1 µg/ml DAPI solution (Merck, Darmstadt, Germany) and the samples were analyzed using a Leica TCS SP5 confocal microscope. As positive controls, we used mesenchymal adult stem cells isolated from the omentum.

The comparison analysis of the percentage of HWJSC and Tr-ELC positive cells was performed for each marker using the exact test of Fisher, based on data obtained from 3,000 cells counted per coverslip. Eight different samples corresponding to eight different individuals were used in triplicate to analyze the expression of these markers in both HWJSC and Tr-ELC.

CD31 and von Willebrand factor immunocytochemistry

Cells from this assay were handled the same way as cells used in the immunofluorescence analysis. To determine the protein expression of the endothelial markers CD31 and von Willebrand factor (VWF), cells were fixed in 4% paraformaldehyde and washed twice with PBS. Then, the endogenous peroxidases were quenched by incubation in diluted H₂O₂ for 15 min and cells were preincubated in 3% BSA in PBS. Then, cells were permeated with PBS containing 0.1% Triton X-100, 1% BSA, and 10% FBS for 45 min at room temperature. After that, primary antibodies anti-CD31 (dilution 1:100) and anti-VWF (dilution 1:1,000) were applied overnight at 4°C. Cells were washed three times with PBS and incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibodies antimouse IgG-biotin conjugate (1/300) for CD31 detection, and antirabbit IgG-biotin conjugate (1/1,000) for VWF

detection. All primary and secondary antibodies used here were from Sigma–Aldrich. Then, samples were washed three times with PBS and incubated for 90 min at room temperature with extrAvidin-alkaline phosphatase (1/200) for CD31 detection, and extrAvidin-peroxidase (1/200) for VWF detection (Sigma–Aldrich). After washing with PBS, CD31 detection was revealed with Fast Red kit (Sigma–Aldrich) and VWF was detected with DAB kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Nuclei were counterstained with light hematoxylin staining. As controls, we used first-passage human umbilical cord endothelial cells (positive controls) and HWJSC (negative controls). The analysis of CD31 and VWF expression in HWJSC and Tr-ELC cultures was developed using eight different samples in triplicate.

Genome-wide gene expression analysis by high-density oligonucleotide microarrays

Total RNA corresponding to primary cultures of HUVEC, HWJSC, and Tr-ELC was extracted using the Qiagen RNeasy System (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), following the manufacturers' recommendations. Once isolated, RNA concentration and quality were determined by using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Then, total cDNA was synthesized with a T7-polyT primer and a reverse transcriptase (Superscript II, Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). In vitro transcription was carried out using biotinylated UTP and CTP (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). Afterward, labeled nucleic acid target was hybridized (45°C for 16 h) to Affymetrix Human Genome UI 133 plus 2.0 oligonucleotide arrays. Finally, after automated washing and staining, absolute values of expression were calculated and normalized from the scanned array by using Affymetrix software. In this work, three samples corresponding to three different individuals were analyzed for each cell type.

Once obtained the expression values for each sample and each gene, we determined the average expression of each gene analyzed in this work (the proliferation marker proliferating cell nuclear antigen (PCNA), the mesenchymal undifferentiation markers CD9, E-cad, and PODXL and 17 vascular endothelial markers) and for each cell type. To evaluate the potential expression change after the cell induction to the endothelial phenotype, the percentage of gene expression increase in Tr-ELC in comparison with the HWJSC was determined. To identify statistical differences between the different cell types, the non-parametric test of Mann–Whitney was used with SPSS 15.0 software. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

Quantitative real-time RT-PCR

First, 500 ng of total RNA corresponding to each cell type were reverse-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Then, the obtained cDNA was used as a template for the amplification and quantification of the different genes analyzed in this work using the following primers: VEGFR-2 (KDR) sense 5'-TCCTGTATGGAGGAGGAGGA-3' and antisense 5'-CGGCTC TTTGCTTACTGTT-3'; EPAS1 sense 5'-CAGTGCTACGCCA CCCAGTA-3' and antisense 5'-CTTGCCATGCCTGACACCT-3'; EDF1 sense 5'-ACGAAAATCAATGAGAAGCC-3' and antisense 5'-GCTTTCCAATGTCCTTTCC-3'; TIE2 sense 5'-TGCCAGATATTGGTGCCT-3' and antisense 5'-CTCATAAAGCGTGGTATTCACGTA-3'. As control of initial cDNA load, the following primers were used for the house-keeping gene GAPDH: sense 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA G-3' and antisense 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'. All reactions were carried out in a 7900 qt-PCR system (Applied Biosystems) using the iQ SYBER Green supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Finally, the gene expression of each gene analyzed was normalized using the GAPDH gene as a control. All the analysis were carried out using three different samples from

three different individuals of each HWJSC and Tr-ELC groups, in triplicate.

Statistical comparison of the expression levels as determined by RT-PCR for HUVEC, HWJSC, and Tr-ELC was carried out by means of the exact test of Fisher. Correlation analysis between expression values determined by RT-PCR and microanalysis was performed by using Pearson correlation test. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant for all tests.

Results

Morphological analysis of HWJSC and Tr-ELC

Histological evaluation of HWJSC cultures generated from the human umbilical cord revealed that these cells displayed a mesenchymal morphology, with fibroblast-like cells whose average dimensions were $136 \pm 21 \times 11 \pm 2 \mu\text{m}$ (Fig. 1). In contrast, when the cells are transdifferentiated to Tr-ELC, these cells become more polygonal and less elongated, measuring $54 \pm 15 \times 45 \pm 17 \mu\text{m}$ (Fig. 1).

Proliferative status of HWJSC and Tr-ELC

The analysis of the proliferation rate of the cells before and after the induction to the endothelial phenotype demonstrated that the proliferation rate of the Tr-ELC was significantly lower in comparison with non-induced HWJSC ($P < 0.0001$ for the test of Wilcoxon) (Fig. 2). The slopes of the proliferation regression lines estimated for HWJSC and Tr-ELC were 29731.4 and 6629.5, respectively.

In addition, our microarray analyses showed that the highest expression of PCNA corresponded to HWJSC (748.9 fluorescent units (f.u.)), with a 41.4% expression decrease after the induction of these cells into Tr-ELC (438.9 f.u.).

Expression of markers of cell undifferentiation by HWJSC and Tr-ELC

As shown in Table I and Figure 3, immunofluorescence for several markers of undifferentiated cell status showed that HWJSC isolated from the human umbilical cord expressed high amounts of the markers of undifferentiated mesenchymal cells CD9, E-cad, and PODXL, along with the characteristic undifferentiated human embryonic stem cell marker SSEA-4

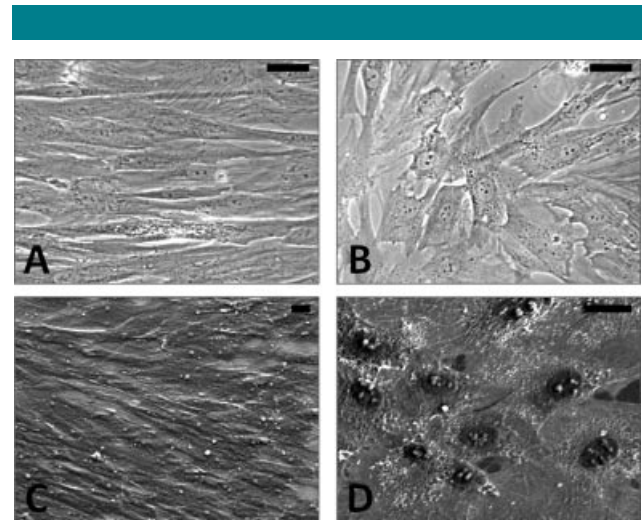


Fig. 1. Morphological analysis of HWJSC (parts A,C) and Tr-ELC (parts B,D) using phase contrast light microscopy of living cells (A,B) and scanning electron microscopy using the back-scattering mode (C,D). Scale bars: 20 μm .

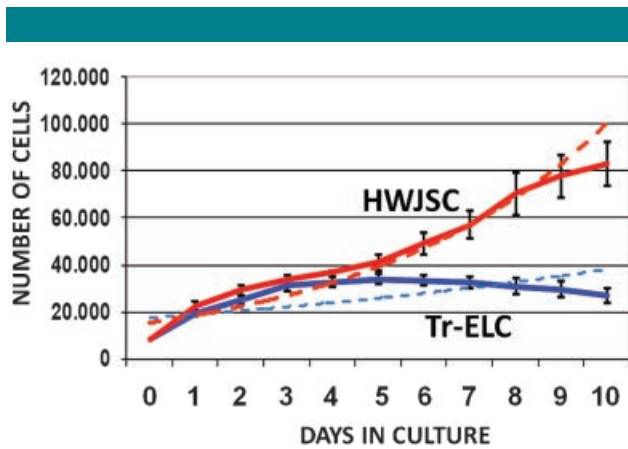


Fig. 2. Proliferation analysis of HWJSC and Tr-ELC. The growth curves correspond to the number of cells per cm^2 (Y-axis) in 10 consecutive days (X-axis). Error bars correspond to standard deviation for each measure and dotted lines represent regression lines for each cell type. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

(18%, 88%, 43%, and 83% positive cells for CD9, E-cad, PODXL, and SSEA-4, respectively). However, a decrease of the percentage of cells showing positive signals for each marker was found after the induction of the cells to Tr-ELC (7%, 83%, 33%, and 63% positive cells for CD9, E-cad, PODXL, and SSEA-4, respectively). Differences were statistically significant for CD9 and SSEA-4.

Similarly, we quantified the mRNA expression levels of several undifferentiation markers by microarray in both HWJSC and Tr-ELC. Since the microarray system used in this work did not contain any probe-sets for SSEA-4, we quantified the expression levels of the markers CD9, E-cad, and PODXL. The results showed that all these genes were downregulated in Tr-ELC in comparison with HWJSC, with HWJSC showing 359.2, 4.1, and 5.2 f.u. for the genes CD9, E-cad, and PODXL, respectively, and Tr-ELC showing 82.1, 2.0, and 1.8 f.u. for the same genes (77.1%, 52.2%, and 65.6% decrease for CD9, E-cad, and PODXL, respectively).

Expression of markers of vascular endothelium differentiation by HWJSC and Tr-ELC

To confirm the endothelial phenotype of the transdifferentiated cells, we quantified the expression levels of several endothelial markers by microarray analysis. As shown in Table 2, our results revealed that the expression of most of the analyzed genes increased after the induction of the cells to the endothelial phenotype, with the only exceptions of the genes VEGF-R2, ECE1, ACE, VEGF, THBD, and PTGIS, whose expression tended to be lower in Tr-ELC than in HWJSC. Differences were statistically significant for the genes CD34,

TABLE 1. Percentage of HWJSC and Tr-ELC showing positive immunofluorescence signals for the differentiation markers CD9, E-cad, PODXL, and SSEA-4

Marker	CD9	E-cad	PODXL	SSEA-4
Positive HWJSC	17.9 \pm 2.4%	87.5 \pm 3.5%	42.9 \pm 3.1%	83.2 \pm 2.3%
Positive Tr-ELC	6.9 \pm 1.8%	83.4 \pm 2.7%	32.5 \pm 2.3%	63.4 \pm 3.3%
P-value	0.0308	0.4222	0.1896	0.0023

All values correspond to average \pm standard deviation of eight different samples of each type analyzed in triplicate. The P values shown in the table correspond to the statistical comparison of the percentage of positive HWJSC versus Tr-ELC using the exact test of Fisher.

CD36, CDH5, ECE2, ICAM2, PECAM1, VEGF-R1, and VWF, with a percentage of gene expression increase that ranged between 776.9% for ECE2 and 41.1% for ICAM2 after the induction to the endothelial phenotype.

Of these genes, the decrease of expression for VEGF in Tr-ELC was consistent with an endothelial differentiation process, since the expression levels of the HUVEC cells were very similar to those of Tr-ELC. As for VEGF-R2 and ECE1, the induction process did not significantly modify the expression levels of these genes, which remained very similar to those of the non-induced cells. However, the decrease was notable in the case of the gene PTGIS, which lowered more than 80% after the induction. Regarding the genes that increased after the induction, all of them showed remarkable expression level increases with the exception of EDFl, which augmented 12%. The rest of the genes encoding for the endothelial markers analyzed in this work showed an increase that ranged between 63.4% for EPAS1 and 776.9% for ECE2.

These data were confirmed by RT-PCR for some of the selected markers, with a good positive correlation between the results obtained by using this technique and the microarray-determined expression levels (Fig. 4). In short, correlation was statistically significant for the genes KDR, with $r = 0.877$ and $P = 0.002$; EPAS1, with $r = 0.998$ and $P = 0.000$; and EDFl, with $r = 0.864$ and $P = 0.003$. Nevertheless, correlation was not statistically significant for the gene TIE2 ($P < 0.05$), although a trend to a positive correlation was found.

Finally, we selected two markers of endothelial function (CD31 and VWF) to determine if protein expression was present by immunocytochemistry. Our results showed that whereas the HWJSC were 100% negative for CD31 immunostaining, 9% of the Tr-ELC displayed positive staining for this marker. In contrast, both HWJSC and Tr-ELC were completely negative for the VWF marker at the protein level (Fig. 5).

Discussion

One of the major limiting factors for the efficient development of a bioengineered vascular conduit is the generation of a luminal surface whose structure is as similar as possible to the natural endothelial blood-vessel lining and that is able to exert the same antithrombogenic functions (Bujan et al., 2004). Most of the times, the engineered arterial grafts try to resemble natural vessels with the use of endothelial cells isolated from large blood vessels and seeded in an appropriate scaffold (Rodriguez-Morata et al., 2008). However, endothelial cells are associated to several problems, including the lack of large vessels available as a source of cells and the low proliferation rate of the endothelial cells in culture. Thus, more recent cardiovascular investigations have turned their attention towards the search for alternative cell sources for use at the blood/biomaterial interface (Bujan et al., 2004). One of the main alternative sources of endothelial cells is the use of transdifferentiated mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells are of great therapeutic potential due to their capacity of self-renewal and multilineage differentiation to several kinds of cells including, among others, retinal pigment epithelial cells, skin epithelial cells, sebaceous duct cells, and tubular epithelial cells in kidney (Jiang et al., 2002; Lu et al., 2006; Phinney and Prockop, 2007). In fact, undifferentiated mesenchymal cells isolated from the peritoneum or the adipose tissue have been used as a substitute of the vascular endothelium, although the results are controversial (Bellon et al., 1997; Arts et al., 2002).

In this milieu, HWJSC may be ideal mesenchymal cell sources due to their accessibility, painless procedures to donors, promising sources for autologous cell therapy and low risk of viral contamination (Lu et al., 2006). By using these cells, Wu et al. (2007b) recently demonstrated that HWJSC are able to

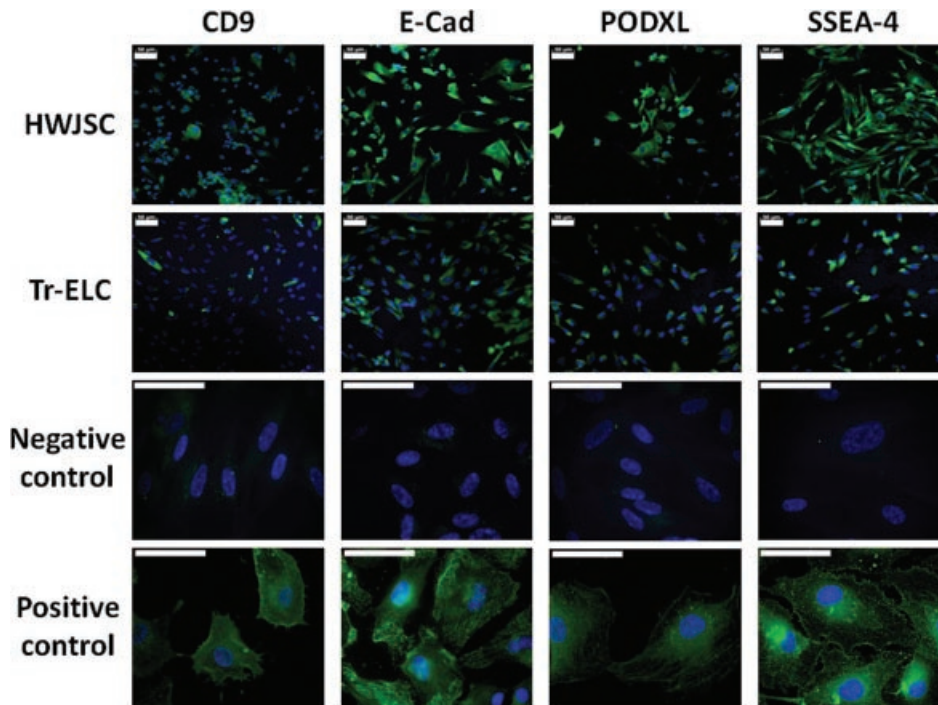


Fig. 3. Immunofluorescence analysis of HWJSC and Tr-ELC for the undifferentiation markers CD9, E-cad, PODXL, and SSEA-4 using FITC-labeled antibodies. Positive and negative controls are shown. Scale bars: 50 μ m.

transdifferentiate into vascular endothelial cells in vitro, and they suggest that a cell population that exhibits characteristics of endothelial progenitor cells could exist within the human umbilical cord (Wu et al., 2007b). However, the specific gene expression patterns that are activated during the transdifferentiation process of these cells to the endothelial phenotype have not been determined to the date.

In the present work, we have carried out a gene expression study to determine the potentiality of HWJSC to transdifferentiate into vascular endothelial-like cells by using specific selective culture media. As shown in this work, the use

of a very simple method resulted in a significant level of cell transdifferentiation of the HWJSC to Tr-ELC as determined by morphological, genetic (microarray and RT-PCR), and immunohistochemical criteria, with a good correlation among the different methods used for more of the genes analyzed. Furthermore, these results were obtained as soon as the first cell subculture.

In the first place, our results demonstrated that HWJSC, expressed not only several markers of mesenchymal undifferentiation (CD9, E-cad, and PODXL), but also the glycolipid antigen SSEA-4, a typical marker of the embryonic

TABLE 2. Gene expression levels for the different endothelial markers analyzed in this work by microarray

Gene symbol	HUVEC average expression	HWJSC average expression	Tr-ELC average expression	Percentage increase	Tr-ELC vs. HWJSC P-value	Tr-ELC vs. HUVEC P-value
AAMP	266.6	227.6	340	49.4	NS	NS
ACE	70.9	6.9	5.3	-22.8	NS	NS
CD34	213.7	9.3	54.7	488.2	0.00328	NS
CD36	15.9	4.2	15.4	264	0.01127	NS
CDH5	1324.7	4.2	34.4	725.6	0.00046	NS
ECE1	335.5	118.9	100	-15.9	NS	NS
ECE2	2.8	1.3	11.4	776.9	0.00013	0.01701
EDF1	1391.2	1297.2	1453.6	12.1	NS	NS
EPAS1	510.1	526	859.7	63.4	NS	0.00507
ICAM2	2674.3	9.9	14	41.1	0.03362	NS
PECAM1 (CD31)	2284.3	6.3	18.8	198.9	0.01471	NS
PTGIS (PGI2)	324.8	84.1	14.7	-82.5	NS	0.02717
THBD	187.2	23.9	7.9	-67	NS	NS
TIE2 (TEK)	27.5	7.9	24.3	206.3	0.03674	NS
VEGF	488.9	763.5	544.1	-28.7	NS	NS
VEGF-R1 (FLT1)	185.7	88.6	198.1	123.6	0.04125	NS
VEGF-R2 (KDR)	322.9	89.9	76.5	-14.9	NS	NS
VWF	1297.5	5.4	16.8	208.3	0.00345	NS

HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; HWJSC, human Wharton's jelly stem cells; Tr-ELC, transdifferentiated HWJSC to the endothelial-like cell phenotype. Percentage increase, percentage of expression rise in Tr-ELC in comparison with the non-induced HWJSC; P values correspond to the statistical comparisons between Tr-ELC versus HWJSC or HUVEC and for each gene; NS, not significant ($P > 0.05$).

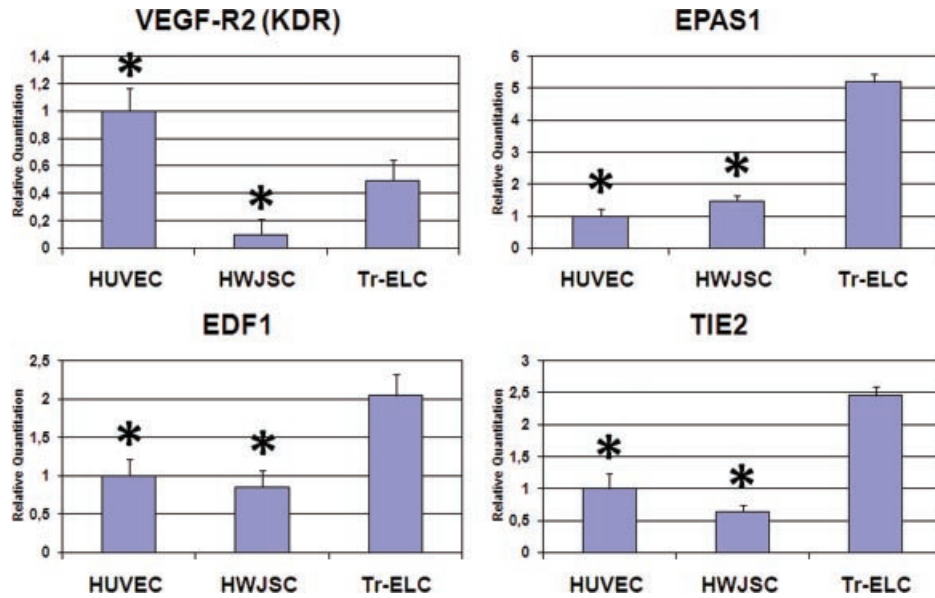


Fig. 4. RT-PCR quantification of the RNA expression of the genes VEGF-R2 (KDR), EPAS1, EDF1, and TIE2 in HUVEC, HWJSC, and Tr-ELC. All expression levels have been normalized in reference of the average expression of HUVEC. Statistically significant expression differences for the comparison of HUVEC versus Tr-ELC and HWJSC versus Tr-ELC are shown with asterisks (Fisher exact test).

cells (Adewumi et al., 2007). Once the cells were induced and transdifferentiated to the endothelial-like phenotype, all analyzed markers of mesenchymal and embryonic undifferentiation showed downregulation at both the RNA and the protein levels (with more than 50% decrease for each RNA), suggesting that HWJSC had successfully differentiated

and the undifferentiation character of the cells had disappeared. The ability of the stem cells to differentiate into adult cell types is necessary for the cells to be used in tissue engineering protocols.

In the second place, our genetic analysis of specific genes related to endothelial cell phenotype and functions demonstrated that several genes and endothelial markers were upregulated in the induced cells (Tr-ELC). Although not all endothelial genes were upregulated to the level of the HUVEC, most of the genes showed a clear pattern of increase after induction, suggesting that the process of endothelial transdifferentiation had been activated. Strikingly, our analysis revealed that the percentage of gene expression increase was significantly higher for some genes and gene functions than for other ones, suggesting that a hierarchical pattern may exist in the process of transdifferentiation into endothelial-like cells.

In this regard, the analysis of genes with a role in endothelial cell differentiation and endothelial phenotype revealed that the process of cell transdifferentiation was efficient at the histological level. In regard of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, which are very closely related to endothelial differentiation, our results showed that VEGF expression significantly decreases as a consequence of the differentiation process of mesenchymal HWJSC to the endothelial phenotype. VEGF is expressed by mesenchymal, epithelial, or tumor cells and is thought to act on nearby endothelium (Couffinhal et al., 1997; Tsurumi et al., 1997). Although recent studies suggest that endothelial cells could produce low amounts of VEGF (Maharaj et al., 2006), which might act in an autocrine way during angiogenesis, endothelial cells are believed not to express VEGF under normal conditions. For those reasons, the loss of expression of this factor upon induction is consistent with an efficient process of cell transdifferentiation to the endothelial lineage. At the same time, our results demonstrated that the induced cells show high levels of expression of the VEGF receptor 1 (FLT1), which reached expression levels that were similar to those of the control HUVEC cells. All these data imply that the receptor/ligand profile of the Tr-ELC was very similar to that of the

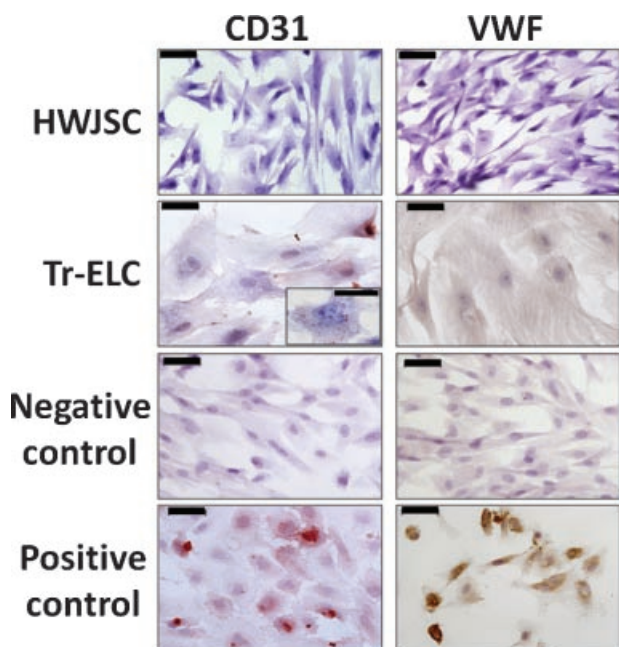


Fig. 5. Protein expression analysis of CD31 and VWF in HWJSC and Tr-ELC as determined by immunocytochemistry. Positive and negative controls are shown. Scale bars: 50 μ m.

HUVEC cells and clearly distinct from the mesenchymal HWJSC. This finding is very interesting because it suggests that the induction process could be successful and these cells could therefore efficiently respond to VEGF signals. In addition, these data further support the idea that HWJSC cells are in the process of losing their mesenchymal character (decrease of VEGF expression) while these cells are acquiring endothelial character (increase of FLT1 expression). However, the expression levels of the VEGFR2 gene did not significantly change after the induction to the endothelial phenotype. Although VEGFR2 is considered to be a relevant signaling receptor for VEGF during angiogenesis (Maharaj et al., 2006), it is important to note that we have induced HWJSC to transdifferentiate into Tr-ELC in a process that is independent from angiogenesis. In fact, as shown above, transdifferentiated cells show very low proliferation levels, implying that Tr-ELC are not angiogenic.

In a similar way, a number of genes involved in endothelial cell phenotype and differentiation showed remarkable overexpression after the induction process. Thus, the level of expression of the endothelial differentiation-related factor 1 (EDF1) and the angioassociated migratory cell protein (AAMP) in Tr-ELC became very similar or even higher to that of HUVEC, suggesting that these cells could be in the process of cell differentiation to the endothelial phenotype (Beckner et al., 1995; Dragoni et al., 1998). Correspondingly, the mRNA expression of CD34, a surface glycoprophosphoprotein that is expressed by hematopoietic stem cells and small vessel endothelial cells (Krause et al., 1996), significantly increased after the induction. In addition to all this, the platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31 or PECAM1), along with the endothelial cell-cell adhesion markers CDH5 and ICAM2, were significantly upregulated in transdifferentiated cells, although the expression levels of Tr-ELC were lower than those of HUVEC cells. Interestingly, the cells expressed a detectable amount of the CD31 marker at the protein level as well. These results imply that the Tr-ELC efficiently adopted the differentiated endothelial phenotype for most of the analyzed markers of mature endothelial cells. However, our gene expression analysis also reveals that some phenotypic characters are acquired before than others. In fact, the expression levels of several relevant endothelial markers did not reach the expression levels found in control HUVEC, suggesting that the induction could be dependent on time and that longer induction periods or physiological activation could be required for a complete endothelial transdifferentiation of the HWJSC. Our results imply that HWJSC could have the potential to transdifferentiate to human endothelial cells upon induction, but the exact conditions that are necessary for a complete transdifferentiation are not known. On the other hand, it is important to note that even fully differentiated native HUVEC tend to partially de-differentiate in culture, losing PGI₂ expression after just three cell passages (Rodriguez-Morata et al., 2008).

In the second place, we have analyzed the expression of several genes related to relevant endothelial functions such as antiaggregation, anticoagulation, and vascular tone regulation. In general, our results show that many of these genes become upregulated upon induction to the endothelial phenotype, but the expression levels that these genes reach is in most of the cases very low in comparison to control HUVEC. This finding suggests that Tr-ELC could not be fully functional at this stage. Two of the genes that were significantly upregulated to the levels of the HUVEC are the thrombospondin receptor CD36, which nearly quadruplicated its expression in the induced cells, and ECE2. On the other hand, one of the key genes involved in endothelial antiaggregation is VWF, encoding for the VWF. In this regard, we found that Tr-ELC show a statistically significant increase of the expression of this gene, although this increase is

minimal in comparison to the control HUVEC and therefore, it does not have protein transduction by immunofluorescence. Several authors previously demonstrated that VWF is a complex macromolecule that is synthesized through a multistep process by endothelial cells, where VWF can be stored in Weibel-Palade bodies (Denis, 2002). Therefore, it would be plausible to state that transdifferentiated cells could require longer induction times and even further functional stimulation in order to efficiently synthesize this factor at both the mRNA and the protein levels. Other genes with a role in vascular antiaggregation are THBD and PGI₂ encoding, respectively, for thrombomodulin and prostacyclin. Our results demonstrated that not only these genes are not upregulated upon induction, but both genes are even downregulated in Tr-ELC. Likewise, ECE1 and ACE, which participate in the control of the vascular tone, were downregulated in Tr-ELC. In this regard, it is important to note that the cells used in this work have been transdifferentiated to the endothelial phenotype, but a functional induction has not been carried out. For that reason, many of the relevant endothelial functions could not be present in the cells, and only the most generic and primitive endothelial functions such as CD36 are activated to the levels of the control HUVEC (Jimenez Cuenca, 2003).

Consistent with the genetic expression changes, our analysis showed that the induction of the HWJSC to the endothelial-like phenotype was associated to both morphological and physiological changes. On the one hand, histological evaluation of the cells before and after the induction revealed that Tr-ELC became polygonal or cobblestone-shaped and formed a flattened cell monolayer that was different to the original fibroblast-like heterogeneous appearance of the non-induced HWJSC. This finding suggests that the cells could be adopting a morphology that is in part similar to that of the native vascular endothelial cells. On the other hand, our cell proliferation analysis demonstrated that upon induction, the cells lose proliferation capabilities and PCNA expression, which is in direct connection with the differentiated adult cell phenotype and supports the loss of the stem cell phenotype. Concomitantly with the downregulation of PCNA, we found an increase of EPAS1 expression. This hypoxia-inducible gene might play a role in the protection of the differentiated cells from entering apoptosis (Chin et al., 2007).

In summary, in this work we have demonstrated that HWJSC are able to transdifferentiate into Tr-ELC upon induction. Although phenotypical differentiation seems to be efficient, some relevant endothelial-related functions are not activated in these cells during the first cell subculture. Further analyses are in need to evaluate all the endothelial functions at mid and long-term and to determine the efficiency of cell stimulation as an inducer of the expression of genes related to major endothelial functions.

Acknowledgments

The authors want to thank Dr. Aníbal Nieto (Division of Gynecology, University Hospital Príncipe de Asturias, Madrid, Spain) and Dr. Juan Carlos Monte Mercado (Division of Gynecology, University Hospital of Guadalajara, Spain) for providing the human umbilical cords used in this work. This work was supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) from the National Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS 06/1784 and FIS 06/1781

Literature Cited

Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, Bello PA, Benvenisty N, Berry LS, Bevan S, Blum B, Brooking J, Chen KG, Choo AB, Churchill GA, Corbel M, Damjanov I, Draper JS, Dvorak P, Emanuelsson K, Fleck RA, Ford A, Gertow K,

- Gertsenstein M, Gokhale PJ, Hamilton RS, Hampl A, Healy LE, Hovatta O, Hyllner J, Imreh MP, Itskovitz-Eldor J, Jackson J, Johnson JL, Jones M, Kee K, King BL, Knowles BB, Lako M, Lebrin F, Mallon BS, Manning D, Mayshay R, McKay RD, Michalska AE, Mikkola M, Mileikovsky M, Minger SL, Moore HD, Mummery CL, Nagy A, Nakatsuji N, O'Brien CM, Oh SK, Olsson C, Otonkoski T, Park KY, Passier R, Patel H, Patel M, Pedersen R, Pera MF, Piekarczyk MS, Pera RA, Reubinfloff BE, Robins AJ, Rossant J, Rugg-Gunn P, Schulz TC, Semb H, Sherrer ES, Siemen H, Stacey GN, Stojkovic M, Sumori H, Szatkiewicz J, Turetsky T, Tuuri T, van den Brink S, Vintersten K, Vuorio S, Ward D, Weaver TA, Young LA, Zhang W. 2007. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25:803–816.
- Alaminos M, Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, Moreu G, Gonzalez-Andrades M, Fernandez-Montoya A, Campos A. 2007a. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* 1:350–359.
- Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Munoz-Avila J, Garcia JM, Crespo PV, Gonzalez-Andrades M, Campos A. 2007b. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol* 211:692–698.
- Amiel GE, Komura M, Shapira O, Yoo JJ, Yazdani S, Berry J, Kaushal S, Bischoff J, Atala A, Soker S. 2006. Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells. *Tissue Eng* 12:2355–2365.
- Arts CH, Hedeman Joosten PP, Blankenstein J, D, Staal FJ, Ng PY, Heijnen-Snyder GJ, Sixma JJ, Verhagen HJ, de Groot PG, Eikelboom BC. 2002. Contaminants from the transplant contribute to intimal hyperplasia associated with microvascular endothelial cell seeding. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 23:29–38.
- Beckner ME, Krutzsch HC, Stracke ML, Williams ST, Gallardo JA, Liotta LA. 1995. Identification of a new immunoglobulin superfamily protein expressed in blood vessels with a heparin-binding consensus sequence. *Cancer Res* 55:2140–2149.
- Bellon JM, Garcia-Honduvilla N, Escudero C, Gimeno MJ, Contreras L, de Haro J, Bujan J. 1997. Mesothelial versus endothelial cell seeding: Evaluation of cell adherence to a fibroblastic matrix using 111In oxine. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 13:142–148.
- Bujan J, Garcia-Honduvilla N, Bellon JM. 2004. Engineering conduits to resemble natural vascular tissue. *Biotechnol Appl Biochem* 39:17–27.
- Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. 2005. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 332:370–379.
- Chin BY, Jiang G, Wegiel B, Wang HJ, Macdonald T, Zhang XC, Gallo D, Cszimadia E, Bach FH, Lee PJ, Otterbein LE. 2007. Hypoxia-inducible factor 1 α stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5109–5114.
- Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, Bo P, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. 2006. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med* 18:1089–1096.
- Couffinhal T, Kearney M, Witzensbichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, Symes J, Isner JM. 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VFP) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 150:1673–1685.
- Denis CV. 2002. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol* 75:3–8.
- Dragoni I, Mariotti M, Consalez GG, Soria MR, Maier JA. 1998. EDF-1, a novel gene product down-regulated in human endothelial cell differentiation. *J Biol Chem* 273:31119–31124.
- Garcia-Honduvilla N, Dominguez B, Pascual G, Escudero C, Minguela F, Bellon JM, Bujan J. 2008. Viability of engineered vessels as arterial substitutes. *Ann Vasc Surg* 22:255–265.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745–2756.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41–49.
- Jimenez Cuenca B. 2003. Mechanism of inhibition of tumoral angiogenesis by thrombospondin-1. *Nefrologia* 23:49–53.
- Kim S, von Recum H. 2008. Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: Cell source, differentiation, selection, and application. *Tissue Eng Part B Rev* 14:133–147.
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. 1996. CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87:1–13.
- Lanni G, Napolitano MM, Scala A, De Rosa P. 2001. "Tube-guided" implant of bioprosthetic shunt for hemodialysis. *Am J Surg* 181:50–51.
- L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. 2007. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med* 357:1451–1453.
- Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. 2006. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 91:1017–1026.
- Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauve Y, Messina DJ, Harris IR, Kihm AJ, Harmon AM, Chin FY, Gosiewska A, Mistry SK. 2007. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* 25:602–611.
- Lupatov AY, Karalkin PA, Suzdal'tseva YG, Burunova VV, Yarygin VN, Yarygin KN. 2006. Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med* 142:521–526.
- Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. 2006. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol* 168:639–648.
- McElreavey KD, Irvine AJ, Ennis KT, McLean WH. 1991. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans* 19:295.
- Mitchell SL, Niklason LE. 2003. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol* 12:59–64.
- Phinney DG, Prockop DJ. 2007. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—Current views. *Stem Cells* 25:2896–2902.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. 2004. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656–663.
- Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, Campos A. 2008. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg* 22:440–448.
- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. 2005. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23:220–229.
- Schmidt D, Breyman C, Weber A, Guenter CI, Neuenschwander S, Zund G, Turina M, Hoerstrup SP. 2004. Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells for tissue engineering of vascular grafts. *Ann Thorac Surg* 78:2094–2098.
- Shen G, Tsung HC, Wu CF, Liu XY, Wang XY, Liu W, Cui L, Cao YL. 2003. Tissue engineering of blood vessels with endothelial cells differentiated from mouse embryonic stem cells. *Cell Res* 13:335–341.
- Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. 2003. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol* 12:271–276.
- Troyer DL, Weiss ML. 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26:591–599.
- Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzensbichler B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM. 1997. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med* 3:879–886.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22:1330–1337.
- Weiss ML, Troyer DL. 2006. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2:155–162.
- Williamson MR, Black R, Kieley C. 2006. PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: Attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells. *Biomaterials* 27:3608–3616.
- Wu HC, Wang TW, Kang PL, Tsuang YH, Sun JS, Lin FH. 2007a. Coculture of endothelial and smooth muscle cells on a collagen membrane in the development of a small-diameter vascular graft. *Biomaterials* 28:1385–1392.
- Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, Gu DS, Han ZC, Liu YL. 2007b. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* 100:608–616.
- Ye ZQ, Burkholder JK, Qiu P, Schultz JC, Shahidi NT, Yang NS. 1994. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12140–12144.

Evaluation of the Cell Viability of Human Wharton's Jelly Stem Cells for Use in Cell Therapy

Ingrid Garzón, D.D.S., Ph.D.,¹ Barbara Pérez-Köhler, B.Sc.,² Juan Garrido-Gómez, M.D., Ph.D.,³ Victor Carriel, M.D., Ph.D.,¹ Renato Nieto-Aguilar, D.D.S., Ph.D.,¹ Miguel Angel Martín-Piedra, D.D.S.,¹ Natalio García-Honduvilla, B.Sc., Ph.D.,² Julia Buján, B.Sc., M.D., Ph.D.,² Antonio Campos, M.D., Ph.D.,¹ and Miguel Alaminos, M.D., Ph.D., B.Sc., Ph.D.¹

Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells (HWJSCs) are gaining attention as a possible clinical source of mesenchymal stem cells for cell therapy and tissue engineering due to their high accessibility, expansion potential, and plasticity. We employed a combination of highly sensitive techniques to determine the average cell viability levels and proliferation capabilities of 10 consecutive cell passages of cultured HWJSCs and then used RNA microarrays to identify genes associated with changes in cell viability levels. We found an initial decrease in cell viability from the first to the third cell passage followed by an increase until the sixth passage and a final decrease from the sixth to tenth cell passages. The highest cell viability levels corresponded to the fifth and sixth passages. The intracellular ionic contents of potassium, sodium, and chlorine suggest that the lower cell viability levels at passages 2, 3, and 8–10 may be associated with apoptotic cell death. In fact, gene expression analysis revealed that the average cell viability was significantly associated with genes with a function in apoptotic cell death, especially pro-apoptotic *FASTKD2*, *BNIP3L* genes and anti-apoptotic *TNFAIP8* and *BCL2L2* genes. This correlation with both pro-apoptotic and anti-apoptotic genes suggests that there may be a complex live-death equilibrium in cultured HWJSCs kept in culture for multiple cell passages. In this study, the highest cell viability levels corresponded to the fifth and sixth HWJSC passages, suggesting that these passages should be preferentially employed in cell therapy or tissue engineering protocols using this cell type.

Introduction

THE UMBILICAL CORD is a major source of nonembryonic stem cells with high proliferation and differentiation capabilities.^{1–3} Among these, mesenchymal stem cells (MSCs) can be isolated for culture from umbilical cord blood⁴ or from Wharton's jelly. Human Wharton's jelly stem cells (HWJSCs) are considered to have an elevated differentiation potential⁵ and telomerase activity⁶ and a low expression of class I and II major histocompatibility complex antigens,^{7,3} making them excellent candidate cells for the generation of artificial tissues by tissue engineering and for use in cell therapy protocols.

Various *in vivo* studies have examined the usefulness of HWJSC to treat different diseases,^{5,8} but the results have been controversial. One possibility is that the stem cells used in some of these studies did not have adequate cell viability levels, which are not usually measured by authors using highly sensitive methods. Only viable cells are suitable for clinical or research utilization, and the effectiveness of most cell therapy and tissue engineering protocols is strongly de-

pendent on the availability of an adequate source of viable and functional cells.^{9,10} One of the key factors in the viability of cultured cells is the cell passage at which they are clinically utilized; thus, some cell cultures established from newborn tissues tend to show a slow proliferation rate beyond the fifth passage.¹¹ However, the cell viability of HWJSCs kept in culture has not been determined to date, and sequential changes that may take place in consecutive cell passages are poorly understood.

Various methods have been used to determine the viability of different cultured cell types. They include techniques that determine permeability alterations in the cell membrane by using trypan blue or other vital dyes,¹² but these are not sufficiently accurate to detect and predict early cell damage, only identifying cell alterations once they have become irreversible. One of the most sensitive and accurate viability assays uses electron-probe X-ray microanalysis to quantify the intracellular contents of the major cell elements, especially potassium (K), sodium (Na), and chlorine (Cl).^{13–16} This highly sensitive technique also allows the simultaneous

¹Department of Histology (Tissue Engineering Group), University of Granada, Granada, Spain.

²Department of Medical Specialities, Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), University of Alcalá, Madrid, Spain.

³Division of Traumatology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

analysis of the intracellular ionic concentrations and ultrastructure of the cells.^{15,17,18} The use of this method has permitted accurate measurement of the intracellular ionic composition of several cell types, including U937,¹⁹ MCF7²⁰ and K562¹⁸ cell lines, and primary cell cultures of human oral mucosa keratinocytes,²¹ umbilical cord endothelial cells,¹⁰ and rabbit cornea endothelial cells.⁹

The recent development of microarray techniques that quantify the expression levels of thousands of genes in a single experiment allows cell viability to be evaluated from a genetic standpoint. Specific cell properties, including toxic stress response and cell viability, can be quantified by using microarrays to measure gene expression levels.²²⁻²⁶

With this background, the aim of this study was to identify the most viable subcultures of HWJSC for use in cell therapy and tissue engineering by means of classical and highly sensitive methods.

Materials and Methods

Isolation and culture of HWJSC

Human umbilical cords were obtained from full-term newborns delivered by cesarean section ($n=10$). After delivery, the umbilical cords were handled under sterile conditions in a tissue bank. Arteries and veins were surgically removed to prevent red blood cell contamination, and small explants of Wharton's jelly were obtained. These explants were then digested in type I collagenase (Gibco BRL Life Technologies) and trypsin 0.5 g/L-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.2 g/L solution (Gibco BRL) for isolation of the stromal cells. Once isolated, HWJSCs were cultured in 75 cm² culture flasks in Amniomax™ culture medium (Gibco BRL) as previously described.¹ Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere. The culture medium was changed once every 3 days, and cell growth was monitored every 12 h by ocular inspection using a phase-contrast light microscope. Once the cells reached subconfluence (42,000 ± 13,500 cells per cm²), cell cultures were trypsinized using trypsin 0.5 g/L-EDTA 0.2 g/L solution at 37°C for 8 min. The number of days between consecutive passages depended on the time taken by the cells to reach subconfluence (mean 5.8 ± 2.6 days between passages), plating subcultured cells in new flasks at a density of 13,333 cells per cm² (1,000,000 cells per flask of 75 cm² of surface). We used identical conditions (culture plates, culture medium, and cell incubator) for all subcultures. The cells were kept in culture for ten consecutive passages (P1 to P10).

Ethical approval for this experimental protocol was granted by the Institutional Ethical and Research Review Board. Parents or guardians of all newborns provided written consent for their inclusion in this study.

Cell proliferation analysis

First, cell proliferation was assessed by means of a highly sensitive Real-Time Cell Analyzer (RTCA; XCELLigence, Roche Applied Science). This analyzer uses sensor electrodes that measure the electronic impedance of cultured cells, yielding the Cell Index (unit-less parameter) to measure the relative change in electrical impedance and represent the cell status. The Cell Index is calculated by dividing the imped-

ance change by a background value and is dependent on the number of cultured cells, because the impedance increases with more cells on the electrodes. In our assays, 30,000 HWJSCs per cm² were cultured on 96-well plates with attached microelectrodes and analyzed for 100 h. All determinations were carried out using duplicates. Data were analyzed using XCELLigence software.

Cell proliferation and viability were then measured by using the water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) colorimetric assay on 10 consecutive cell passages of HWJSC (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics). WST-1 is a tetrazolium dye containing an electron coupling reagent that is cleaved by the mitochondrial dehydrogenase enzyme to a formazan dye. The reaction directly correlates with the number of metabolically active proliferating cells and can serve as a marker of cell viability and cell proliferation. For this analysis, 20,000 cells were seeded per well in a 96-well plate with 100 μL of culture medium. After 24 h, the medium was replaced with fresh medium containing 1/10 volume of cell proliferation reagent WST-1 and incubated for 4 h at 37°C before the absorbance at 450 nm was quantified in a spectrophotometer. Cells incubated for 15 min in 1% triton-X were used as controls. The data presented are from five separate experiments.

Cell viability analysis

The percentage of live and dead cells in each cell passage was determined by means of the trypan blue dye exclusion test. Briefly, each subconfluent cell culture was trypsinized with trypsin 0.5 g/L-EDTA 0.2 g/L solution for 8 min at 37°C, and the detached cells were harvested by centrifugation and resuspended in 1 mL of culture medium. Then, 100 μL of the cell suspension were mixed with 0.4% trypan blue solution (Sigma-Aldrich ref. T8154) and incubated for 5 min. at room temperature. Finally, we quantified the number of white and blue cells by using a Neubauer chamber in a Nikon Eclipse 90i light microscope to count a minimum of 200 cells per cell passage, enabling calculation of the percentage of live and dead cells. All cell counts were done in quadruplicate, and median values and means (with standard deviations) were calculated for each cell passage.

For the LIVE/DEAD® Cell Viability Assay in each cell passage, 10,000 HWJSCs were cultured on chamber slides (Lab-Tek Chamber Slides, Nunc) and allowed to attach to the bottom for 24 h. Then, cells were washed twice with PBS and stained with the LIVE/DEAD® assay reagents (calcein/AM and ethidium homodimer-1; Invitrogen) following the protocols supplied by Invitrogen. Finally, the number of live (green) and dead (red) cells was determined by using a fluorescence microscope. These experiments were carried out in quadruplicate, and the mean percentage of live cells was calculated for each cell passage.

For electron-probe X-ray microanalysis, subconfluent HWJSCs were subcultured using trypsin-EDTA on plated gold grids coated with a thin layer of Pioloform (polyvinyl butyral) (Ted Pella, Inc.) following previously published methods.^{9,21,27} Cells were seeded at a density of 5000 cells per grid and cultured in Amniomax medium. After 24 h of culture on the Pioloform-coated gold grids, support grids containing the HWJSCs were washed in ice-cold distilled water for 5 s to remove the extracellular medium. After

washing, excess water was drained from the surface, and the grids were immediately plunge-frozen in liquid nitrogen.¹⁸ After cryofixation, the grids were placed in a precooled aluminum specimen holder at liquid nitrogen temperature and freeze dried at increasing temperatures for 24 h in an E5300 Polaron freezer-drier apparatus equipped with a vacuum rotatory pump system. Freeze-dried gold grids were carbon coated in a high-vacuum coating system and microanalyzed within 6 h. Electron probe X-ray microanalysis of the specimens was performed with a Philips XL30 scanning electron microscope (SEM) equipped with an EDAX DX-4 microanalytical system and a solid-state backscattered electron (BSE) detector. The samples were examined by SEM with a combination of secondary electron and BSE imaging modes. For X-ray microanalysis, the analytical conditions were tilt angle 08, take-off angle 61.348, and working distance 10 mm. The acceleration voltage was 10 kV. All spectra were collected in the spot mode at 10,000 \times (equivalent to 50 nm spot diameter) for 200 s live time, and the number of counts per second recorded by the detector was around 500. All determinations were performed on the central area of the cell nucleus. To determine total ion content, we used the peak-to-local-background ratio method²⁸ with reference to standards composed of 20% dextran containing known amounts of inorganic salts.²⁹ In this study, we analyzed the ionic content of 25 HWJSCs corresponding to each cell passage (P1 to P10) using cells from four different umbilical cords. Controls were human fibroblasts isolated from oral mucosa biopsies (highly viable cells) and the same cells treated with 10 mM HEMA, a known inductor of cell apoptosis³⁰ (cells with low viability levels).

Flow cytometry

To evaluate the expression of key MSC markers on the different HWJSC cultures used in this study, cells corresponding to passages P1, P3, P6, and P9 were analyzed using anti-CD90-Allophycocyanin conjugated (CD90-APC) and anti-CD45-Phycoerythrin conjugated (CD45-PE) antibodies (R & D Systems, Inc.). Samples containing 0.5×10^6 cells were placed in flow cytometry tubes, washed with 2 mL of staining buffer (R & D Systems, Inc.), and Fc receptors were then blocked by incubating the cells for 5 min with 2 mL of PBS 1 \times containing 0.1% BSA and 0.1% FBS. Next, cells were stained with the antibodies and isotype controls in different tubes and incubated for 45 min at 4°C in darkness. Cells were washed with 2 mL of staining buffer, and samples were immediately acquired on an FACS CALIBUR Flow Cytometer.

Multilineage cell differentiation analysis

The multilineage differentiation potential of isolated HWJSCs was confirmed by subculturing primary HWJSC cultures on chamber slides and inducing differentiation to osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lineages by using specific conditioning media as previously described.³¹ Then, cell differentiation was assessed by cytochemical histological staining, staining samples with 2% Alizarin Red S for 5 min at room temperature to detect the osteoblastic phenotype and identify any signs of mineralization. Chondrogenesis was confirmed by mucopolysaccharide staining using Alcian Blue solution (1% alcian blue 8GX and 3% glacial acetic acid, pH adjusted to 2.5). Adipogenic differ-

entiation was identified by Oil Red O staining (0.7 mg in 100 mL of propylene glycol) for 5 min at 60°C. All these cell differentiation assays were carried out at selected passages (P1, P3, P6 and P9) to ascertain that HWJSCs retain their stem cell nature throughout the ten cell passages.

Microarray analysis

Total RNA was isolated from three different samples corresponding to three different individuals at each HWJSC passage (P1 to P10) by using the Qiagen RNeasy SystemTM. Total RNA was converted into cDNA using a reverse-transcriptase (Superscript II, Life Technologies, Inc.) and T7-oligo(dT) primer. Subsequently, biotinylated cRNA was generated by using a T7 RNA polymerase and biotin-11-uridine-5'-triphosphate (Enzo Diagnostics). Labeled cRNA were chemically fragmented to facilitate the hybridization process and hybridized to Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 oligonucleotide arrays for 6 h at 45°C. Finally, all expression values were normalized using the software provided by Affymetrix to obtain comparable data and to identify present (expressed) and absent (unexpressed) genes at each cell passage. All expression data are publically available at the public functional genomics data repository supporting minimum information about a microarray experiment (MIAME)-compliant data submissions GeneExpressionOmnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30391).

Once expression levels were obtained for all probe sets, all genes with apoptosis-related function were selected by using the information supplied by Affymetrix. In addition, all MSC markers proposed by the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy³² were selected and analyzed at each cell passage (CD105, CD73, CD90, CD11B, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79A, and HLADR) along with the cell proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and MKI67.

Statistical analysis

The nonparametric Friedman test was used to evaluate the statistical significance of differences among the 10 cell passages analyzed. Pair-wise comparisons between two successive cell subcultures were carried out using the nonparametric Wilcoxon's test. A Bonferroni-adjusted significance level of ≤ 0.001 was considered for multiple comparisons, because up to 48 statistical comparisons were performed simultaneously using the Wilcoxon's test. The Spearman correlation test was used to establish correlations between distributions corresponding to cell viability and cell proliferation. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 16.00 software package was used for the statistical analysis.

In order to calculate average cell viability levels (ACVLs) for each cell passage, the raw cell viability values determined by trypan blue, WST-1, LIVE/DEAD,[®] and K/Na index were first normalized to z-scores (mean=0 and standard deviation=1) using the formula: $Z = (X - \mu) / \sigma$, where μ is the average cell viability obtained for each method, X is the specific cell viability for a particular cell passage, and σ is the standard deviation for each method. Then, mean z-scores values were obtained for each of the 10 cell passages analyzed.

For the microarray analysis, we used the Pearson (r) correlation test to determine the correlation between each probe set and the ACVL for each cell passage. All genes

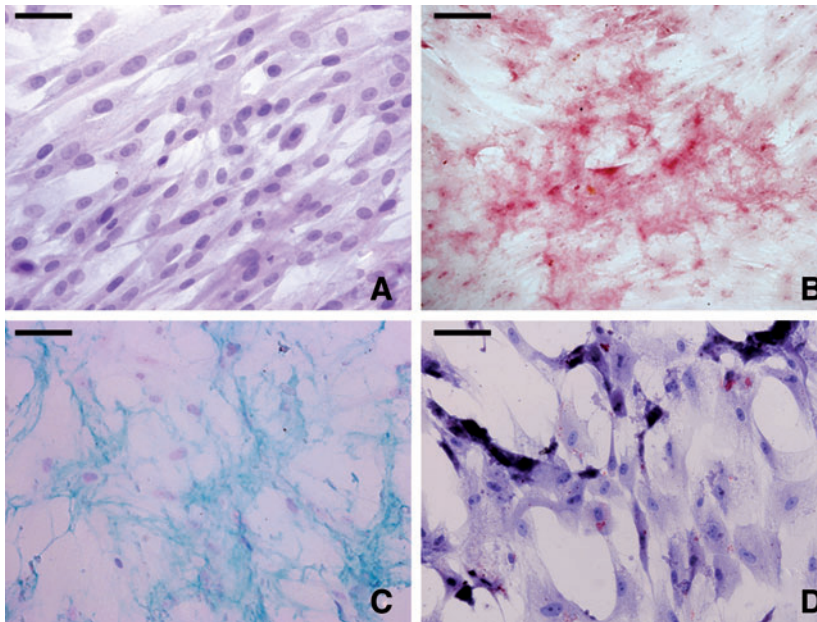


FIG. 1. Multi-lineage differentiation capabilities of the cultured HWJSCs at cell passage P1. **(A)** Undifferentiated control HWJSCs (H&E staining). **(B)** HWJSCs differentiated to the osteogenic cell type showing positive calcium deposits by alizarin red staining. **(C)** Differentiation to the chondrogenic phenotype (alcian blue staining). **(D)** Adipogenic differentiation (oil red O). Scale bars: 50 μm . HWJSCs, Wharton's jelly stem cells. Color images available online at www.liebertonline.com/tec

with an absolute r correlation coefficient >0.700 were selected as being statistically significant. Gene Ontology (GO) analysis of the selected genes was performed using BiNGO (www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/), a plug-in for the Cytoscape program.³³ The set of selected genes was tested for enrichment of any GO category in comparison to all annotated genes represented in the array. Scores were evaluated based on the hypergeometric distribution and using Bonferroni correction for multiple testing.³⁴ To identify apoptosis-related genes whose expression was significantly associated with the ACVL at the different cell passages, we first selected all probe sets with a role in apoptosis or anti-apoptosis by using the information provided by Affymetrix. These apoptosis-related genes were then analyzed with version 3.09b of the significance analysis of microarrays (SAM) software of Stanford University, using a δ value that permitted a false discovery rate of 0 (i.e., no genes are falsely named). A multiclass analysis of genes associated with the ACVLs was performed. The program is available at www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/.

Results

Culture and characterization of HWJSCs isolated from human umbilical cord

Histological evaluation of HWJSC cultures from human umbilical cord revealed that the cells were adherent and displayed a typical mesenchymal morphology, with spindle and star-shaped cells. Specific conditioning media were used to efficaciously differentiate the isolated HWJSCs in this study to osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lineages, as determined by alizarin red S, alcian blue, and oil red O staining, respectively, at all cell passages analyzed (P1, P3, P6, and P9). Illustrative examples of the multi-lineage differentiation capability of HWJSCs at the first passage are shown in Figure 1. Microarray analysis of specific MSC markers showed high expression of *CD105*, *CD73*, and *CD90* and no expression of *CD11B*, *CD14*, *CD19*, *CD34*, *CD45*, *CD79A*, and *HLADR* at all 10 cell passages (P1 to P10; Table 1). Flow cytometry study confirmed the high expression of *CD90* and the absence of *CD45* expression in HWJSCs corresponding to the first, third, sixth, and ninth cell passages (Fig. 2).

TABLE 1. mRNA EXPRESSION OF RELEVANT MSC MARKERS AS DETERMINED BY MICROARRAY IN WHARTON'S JELLY STEM CELLS AT PASSAGES 1 TO 10 (P1 TO P10)

GENE	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
<i>CD105</i>	143.0 (P)	138.2 (P)	155.2 (P)	176.0 (P)	177.3 (P)	132.1 (P)	150.2 (P)	245.4 (P)	198.5 (P)	243.7 (P)
<i>CD73</i>	598.1 (P)	847.5 (P)	1052.5 (P)	1167.4 (P)	1205.9 (P)	892.3 (P)	1184.5 (P)	1519.1 (P)	1553.1 (P)	1785.2 (P)
<i>CD90</i>	2126.9 (P)	1438.8 (P)	1572.0 (P)	1783.5 (P)	1564.7 (P)	1416.3 (P)	2237.6 (P)	1874.2 (P)	1735.8 (P)	1732.5 (P)
<i>CD11B</i>	8.5 (A)	10.9 (A)	7.0 (A)	9.5 (A)	10.9 (A)	9.9 (A)	12.6 (A)	4.5 (A)	11.6 (A)	16.9 (A)
<i>CD14</i>	23.6 (A)	10.8 (A)	5.3 (A)	7.7 (A)	3.9 (A)	3.6 (A)	1.5 (A)	1.6 (A)	4.7 (A)	5.8 (A)
<i>CD19</i>	5.1 (A)	6.9 (A)	6.9 (A)	6.4 (A)	4.9 (A)	4.7 (A)	7.3 (A)	7.3 (A)	7.0 (A)	3.1 (A)
<i>CD34</i>	12.0 (A)	9.3 (A)	11.0 (A)	9.2 (A)	14.1 (A)	8.6 (A)	9.7 (A)	8.1 (A)	14.6 (A)	24.3 (A)
<i>CD45</i>	3.4 (A)	3.4 (A)	2.5 (A)	2.8 (A)	3.0 (A)	4.4 (A)	2.9 (A)	5.0 (A)	5.3 (A)	3.4 (A)
<i>CD79A</i>	28.5 (A)	33.7 (A)	22.7 (A)	38.2 (A)	29.0 (A)	31.5 (A)	38.2 (A)	23.5 (A)	25.7 (A)	24.2 (A)
<i>HLADR</i>	7.9 (A)	11.2 (A)	8.6 (A)	8.0 (A)	7.5 (A)	8.9 (A)	7.1 (A)	9.2 (A)	7.8 (A)	8.3 (A)

It shows the mean expression of each marker at each cell passage. A, absent gene expression; P, present gene expression (by Affymetrix array).

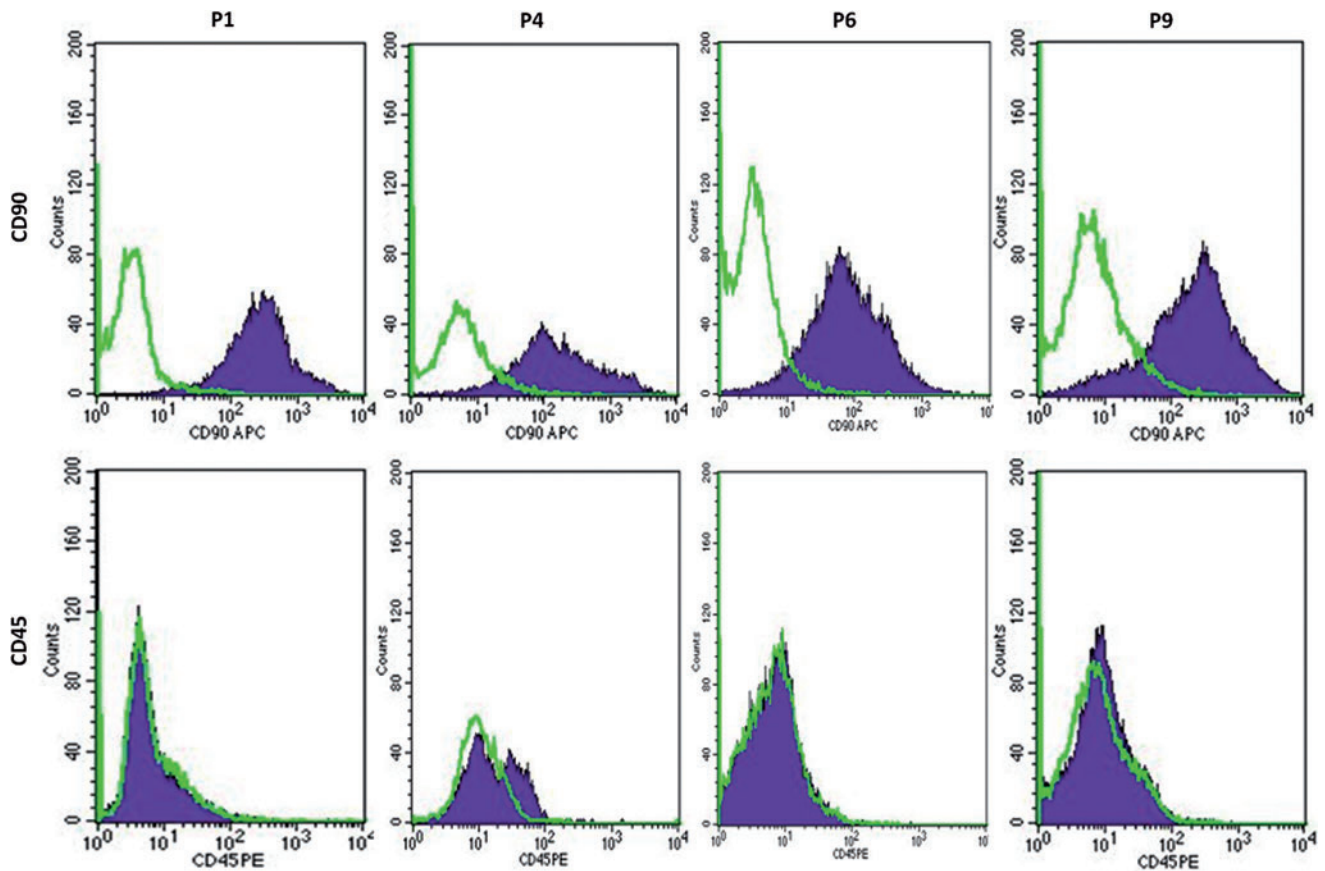
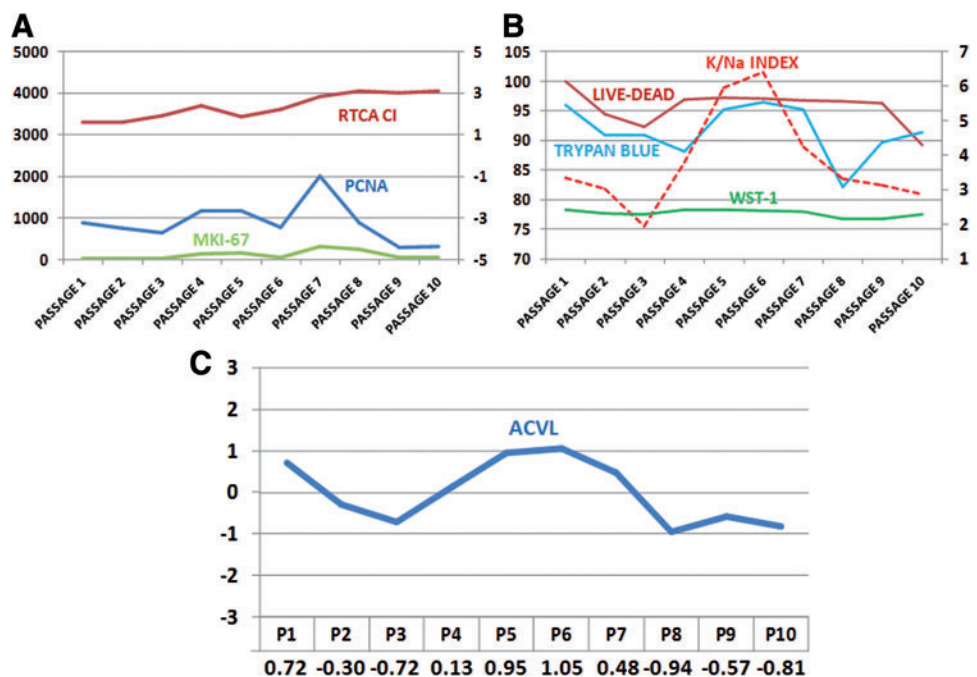


FIG. 2. Flow cytometry analysis of *CD90* (positive MSC marker) and *CD45* (negative MSC marker) in HWJSCs at passages P1, P4, P6, and P9. Cells showing positive expression of each marker are shown in blue; green lines show the expression of cells labeled with the control isotypes. Color images available online at www.liebertonline.com/tec

FIG. 3. Analysis of cell proliferation and cell viability of 10 successive passages of HWJSC. (A) Cell proliferation as determined by RTCA Real-Time Cell Analysis Cell Index (RTCA CI) and microarray analysis of *PCNA* and *MKI-67*. (B) Cell proliferation as determined by electron-probe X-ray microanalysis (potassium/sodium index), trypan blue exclusion analysis, LIVE/DEAD® Cell Viability Assay, and WST-1. (C) Average cell viability level (ACVL). WST-1, water-soluble tetrazolium salt-1. Color images available online at www.liebertonline.com/tec



Cell proliferation analysis of ten consecutive cell passages of HWJSC

Microarray expression analysis of PCNA and MKI67 genes showed no significant differences from the first to the tenth cell passage (Fig. 3).

Application of highly sensitive RTCA revealed a highly similar Cell Index in all 10 subcultures analyzed (Table 2 and Fig. 3). According to the WST-1 assay results, the HWJSC proliferation index tended to remain stable over the 10 cell passages, with no statistically significant differences among the passages (Table 2 and Fig. 3).

Sequential cell viability analysis of HWJSCs

Trypan blue staining showed that the cell viability of the successive HWJSC subcultures was in general very high, with >82% viable cells at each of the 10 cell passages analyzed (Fig. 3 and Table 2). No significant differences were observed among the different cell passages ($p > 0.001$, Wilcoxon test).

LIVE/DEAD® Cell Viability Assay results showed a nonsignificant decrease in the percentage of live cells from the first to the third passage and a nonsignificant increase at the fourth, with the percentage then remaining stable until the ninth passage followed by a decrease to the tenth passage, when the lowest percentage of live cells was found (Fig. 3 and Table 2). Although statistical significance was not reached, there was a tendency for these percentages to correlate with the K/Na index of the cells as determined by electron-probe X-ray microanalysis ($p = 0.0022$ and $r = 0.8428$, Spearman correlation test, for mean K/Na index values vs. mean LIVE/DEAD® Cell Viability) and with cell viability and cell proliferation levels as determined by WST-1 assay ($p = 0.0117$ and $r = 0.7538$, Spearman correlation test).

Microanalytical analysis of 10 consecutive HWJSC subcultures showed generally high K/Na ratios for these stem cells, ranging from 1.94 for the third cell passage to 6.40 for the sixth passage (Table 3 and Fig. 4). The Friedman test for multiple samples revealed significant differences ($p < 0.001$) among the 10 cell passages in the intracellular ionic concentration of all elements analyzed (Ca, Na, K, Mg, P, Cl, and S; Table 4). Pairwise comparisons between consecutive cell subcultures (Wilcoxon test) demonstrated a tendency for several elements to increase or decrease their intracellular concentrations with a higher number of passages. Intracellular K concentrations tended to decrease from the first to the third passage, including a statistically significant difference between the second and the third passages, followed by an increase until the seventh passage and then a statistically significant decrease to the eighth passage and a continuing decline to the tenth passage (Tables 3 and 4 and Fig. 4). In contrast, intracellular Na concentrations showed a nonsignificant increase from the first to the second and third passages, a decrease from the third to the fourth passage, and an increase from the fifth to the seventh passage, decreasing thereafter (Tables 3 and 4 and Fig. 4). Intracellular Cl concentrations significantly decreased from the first to the second cell passage and from the sixth to the seventh passage and then significantly increased from the seventh to the eighth passage. Intracellular P concentrations significantly decreased from the first to the second cell passages and from the seventh to the eighth passages. Intracellular Ca

TABLE 2. ANALYSIS OF CELL PROLIFERATION AND CELL VIABILITY AT SUCCESSIVE HUMAN UMBILICAL CORD WHARTON'S JELLY STEM CELL PASSAGES (P1 TO P10) WATER-SOLUBLE TETRAZOLIUM SALT-1; MITOCHONDRIAL FUNCTION DETERMINED BY WATER-SOLUBLE 1-TETRAZOLIUM SALT-1

Cell passage	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
WST-1	Mean	2.41	2.31	2.42	2.42	2.41	2.37	2.15	2.15	2.28
	Median	2.43	2.37	2.30	2.43	2.41	2.39	2.15	2.23	2.27
	Q1-Q3	2.39 2.44	2.37 2.38	2.26 2.34	2.41 2.43	2.40 2.42	2.31 2.46	2.10 2.21	2.19 2.23	2.25 2.31
RTCA CI	Mean	1.60	1.62	1.94	2.42	2.22	2.86	3.11	3.03	3.11
	Median	1.61	1.56	1.94	2.79	2.31	2.90	3.21	3.16	2.97
	Q1-Q3	1.01 2.21	1.05 2.18	1.30 2.50	1.43 3.22	1.61 2.92	2.50 3.26	2.98 3.30	2.80 3.25	2.71 3.60
Trypan blue	Mean	95.91	90.98	90.91	88.15	96.40	95.14	82.13	89.71	91.30
	Median	96.69	92.64	91.15	90.05	96.16	94.98	82.09	89.78	91.23
	Q1-Q3	94.67 97.57	89.00 94.67	89.87 93.64	82.23 94.28	95.24 97.25	93.26 98.04	79.81 84.42	89.04 90.45	88.18 94.36
LIVE/DEAD®	Mean	100	94.43	92.35	96.95	97.04	96.73	96.66	96.22	89.35
	Median	100	96.49	92.31	97.52	97.20	97.39	97.16	96.32	89.25
	Q1-Q3	100 100	93.15 96.88	90.23 95.73	95.10 98.87	95.42 98.99	94.24 100	95.78 99.17	95.41 97.59	96.16 96.48

WST-1, water-soluble tetrazolium salt-1; RTCA CI, real-time cell analyzer cell index. Trypan blue: percentage of live cells in each cell passage by trypan blue exclusion test. LIVE/DEAD®: percentage of live cells in each cell passage by calcein/AM and ethidium homodimer-1. Mean and median values and first and third quartiles (Q1-Q3) are shown for each passage and each technique.

TABLE 3. INTRACELLULAR IONIC CONCENTRATIONS OF CALCIUM, CHLORINE, POTASSIUM, MAGNESIUM, SODIUM, PHOSPHOROUS, AND SULFUR, AND POTASSIUM/SODIUM RATIO AT HWJSC PASSAGES (P1 TO P10)

Cell passage	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Ca	Mean	17.00	14.21	4.74	3.72	6.48	5.26	20.69	12.33	14.13
	Median	16.57	12.18	3.90	3.70	6.00	5.20	17.30	12.67	15.35
Cl	Q1-Q3	4.87 14.62	6.82 19.49	0.00 8.28	0.01 6.00	0.03 11.00	0.00 9.26	14.13 23.76	6.70 18.76	8.04 18.76
	Mean	202.55	137.56	176.37	172.19	195.33	74.75	203.15	171.00	181.21
K	Median	194.69	105.33	149.21	158.79	197.09	56.65	152.73	170.76	166.77
	Q1-Q3	168.36 241.77	104.53 177.14	90.17 145.22	141.23 196.29	174.75 217.04	31.92 100.54	132.38 201.40	153.00 192.70	150.81 194.10
Mg	Mean	419.31	385.93	268.31	412.34	457.81	460.99	331.16	272.45	267.69
	Median	411.19	376.33	235.33	378.89	456.31	467.59	331.47	270.45	275.07
Na	Q1-Q3	362.49 510.66	355.31 405.55	172.27 340.95	292.76 421.96	378.38 459.90	431.19 515.27	294.81 351.08	259.43 310.45	217.52 307.11
	Mean	30.65	23.12	25.49	30.50	32.72	35.49	23.51	24.33	22.82
P	Median	31.73	22.74	24.85	29.08	32.79	34.37	24.33	24.85	22.21
	Q1-Q3	23.27 35.43	14.28 31.73	21.15 30.14	26.44 33.32	28.03 34.90	29.61 40.19	20.09 27.10	20.23 26.84	21.15 24.85
S	Mean	125.56	127.97	138.55	92.84	69.34	108.41	99.99	86.64	93.25
	Median	89.01	94.10	133.09	72.06	54.25	116.98	92.40	79.68	77.99
K/Na	Q1-Q3	62.73 193.28	52.56 169.54	93.25 175.48	45.78 95.79	40.69 72.90	60.19 142.42	65.06 128.85	68.45 90.07	57.22 114.65
	Mean	275.15	220.79	235.51	260.34	277.53	286.99	214.89	224.26	225.99
P	Median	283.01	233.88	228.34	255.33	282.32	285.08	217.62	234.23	225.58
	Q1-Q3	242.18 298.92	186.83 268.48	207.59 256.71	236.65 287.85	267.09 294.08	255.33 317.61	265.71 307.92	189.25 236.65	213.29 240.45
S	Mean	50.14	50.05	57.59	54.17	45.19	56.26	66.16	57.55	59.19
	Median	52.27	47.92	58.81	54.99	45.19	56.08	67.25	58.81	57.44
K/Na	Q1-Q3	38.66 61.53	35.94 68.61	51.73 65.88	44.65 63.16	34.85 55.54	46.28 66.97	59.76 74.60	46.96 66.84	51.46 70.38
	Mean	3.34	3.02	1.94	3.78	5.95	4.25	3.31	3.14	2.87

All concentrations are expressed in millimoles of each element per kilogram of cell dry weight. Mean and median values are shown, followed by the first and third quartiles (Q1-Q3). The bottom row corresponds to the K/Na ratio (based on mean K and Na concentrations at each cell passage).

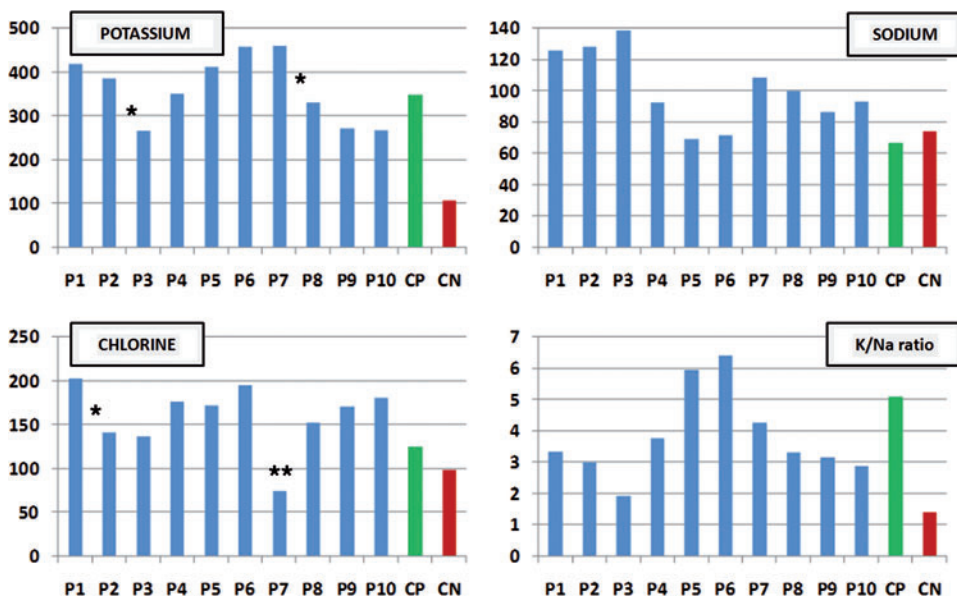


FIG. 4. Histograms representing the mean intracellular concentrations of potassium, sodium, and chlorine and the K/Na ratio for the ten consecutive HWJSC passages (P1 to P10). Statistically significant changes (increases or decreases) are indicated with asterisks. Green bars correspond to the control human fibroblasts, while red bars represent the same cells treated with 10 mM HEMA to induce apoptosis. All measures are expressed as millimoles per kilogram of cell dry weight. Color images available online at www.liebertonline.com/tec

significantly decreased from the third to the fourth passage and significantly increased from the seventh to the eighth passage. Intracellular S significantly increased from the fifth to the sixth passage and then significantly decreased from the sixth to the seventh passages, and intracellular Mg significantly increased from the seventh to the eighth passages.

Based on the results of the trypan blue, LIVE/DEAD, WST-1, and electron-probe X-ray microanalysis assays, we calculated the ACVL for each cell passage. As shown in Figure 3, the highest ACVLs corresponded to the sixth and fifth cell passages and the lowest to the eighth and tenth passages.

Identification of genes associated with cell viability at different cell passages

Correlation analysis of all genes in the array revealed a significant positive correlation between ACVL and 630 probe sets and a significant negative correlation between ACVL and 801 probe sets (data available on request). Functional analysis of these genes (Table 5) showed an overrepresentation of 10 gene functions among the 630 probe sets positively correlated with cell viability, which were all re-

lated to the synthesis and maintenance of cell components and cell structures (Table 5). No gene functions were overrepresented among the 801 probe sets negatively correlated with ACVL.

SAM analysis of apoptosis-related genes revealed five probe sets encoding for four different genes whose expression was significantly associated with ACVL (Fig. 5). Two of these genes (*FASTKD2* and *BNIP3L*) have been associated with pro-apoptotic functions, and two (*TNFAIP8* and *BCL2L2*) have been associated with anti-apoptotic functions.

Discussion

MSCs derived from the human umbilical cord are being considered a potential alternative source to bone marrow-derived MSCs for cell therapy.⁴ HWJSCs are more readily accessible and have a greater expansion potential in comparison to bone marrow-derived MSCs,³⁵ which can only be obtained after a painful and invasive procedure. Moreover, it has been suggested that HWJSCs are immune privileged and could, therefore, be tolerated in allogeneic transplantation.³⁶ In this study, HWJSCs were found to fulfill all of the main criteria for the use of human MSCs in cell therapy and tissue

TABLE 4. SIGNIFICANCE (P) VALUES FOR DIFFERENCES IN INTRACELLULAR IONIC CONCENTRATIONS OF CALCIUM, CHLORINE, POTASSIUM, MAGNESIUM, SODIUM, PHOSPHOROUS, AND SULFUR AMONG CONSECUTIVE HWJSC PASSAGES (P1 TO P10)

Cell passages compared	P1–P2	P2–P3	P3–P4	P4–P5	P5–P6	P6–P7	P7–P8	P8–P9	P9–P10	All (Friedman)
Ca	0.101	0.276	0.000 ^a	0.602	0.117	0.248	0.000 ^a	0.012	0.610	0.000 ^a
Cl	0.001 ^a	0.427	0.065	0.242	0.067	0.000 ^a	0.000 ^a	0.139	0.241	0.000 ^a
K	0.211	0.001 ^a	0.030	0.035	0.030	0.696	0.000 ^a	0.284	0.878	0.000 ^a
Mg	0.014	0.174	0.063	0.247	0.964	0.125	0.001 ^a	0.575	0.414	0.000 ^a
Na	0.830	0.545	0.006	0.607	0.192	0.012	0.970	0.386	0.047	0.000 ^a
P	0.000 ^a	0.253	0.062	0.135	0.304	0.840	0.000 ^a	0.386	0.721	0.000 ^a
S	0.788	0.187	0.326	0.022	0.000 ^a	0.000 ^a	0.035	0.169	0.959	0.000 ^a

The nonparametric Wilcoxon test was used for pair-wise comparisons. The nonparametric Friedman test was used for global comparisons.
^aStatistically significant *p*-values.

TABLE 5. CYTOSCAPE-BiNGO FUNCTIONAL ANALYSIS OF GENES SHOWING A SIGNIFICANT POSITIVE CORRELATION ($R > 0.7$) WITH AVERAGE CELL VIABILITY LEVELS IN TEN CONSECUTIVE HWJSC PASSAGES, AS DETERMINED BY MICROARRAY

GO-ID	p-value	Corrected p-value	Gene functions
5739	3.13E-08	4.15E-05	Mitochondrion
5622	2.49E-05	1.65E-02	Intracellular
43231	5.26E-05	1.79E-02	Intracellular membrane-bound organelle
43227	5.41E-05	1.79E-02	Membrane-bound organelle
313	9.16E-05	2.02E-02	Organelle ribosome
5761	9.16E-05	2.02E-02	Mitochondrial ribosome
44429	2.19E-04	3.47E-02	Mitochondrial part
314	2.36E-04	3.47E-02	Organelle small ribosomal subunit
5763	2.36E-04	3.47E-02	Mitochondrial small ribosomal subunit
44424	3.68E-04	4.89E-02	Intracellular part

GO-ID, gene ontology reference for each specific term or gene function; p-value: statistical significance of the overrepresentation of each GO term or gene function using a hypergeometric distribution; Corrected p-value: statistical significance of the overrepresentation of each GO term or gene function using a hypergeometric distribution with Bonferroni correction for multiple testing; Gene functions: GO terms identified by Cytoscape-BiNGO with a significant p-value.

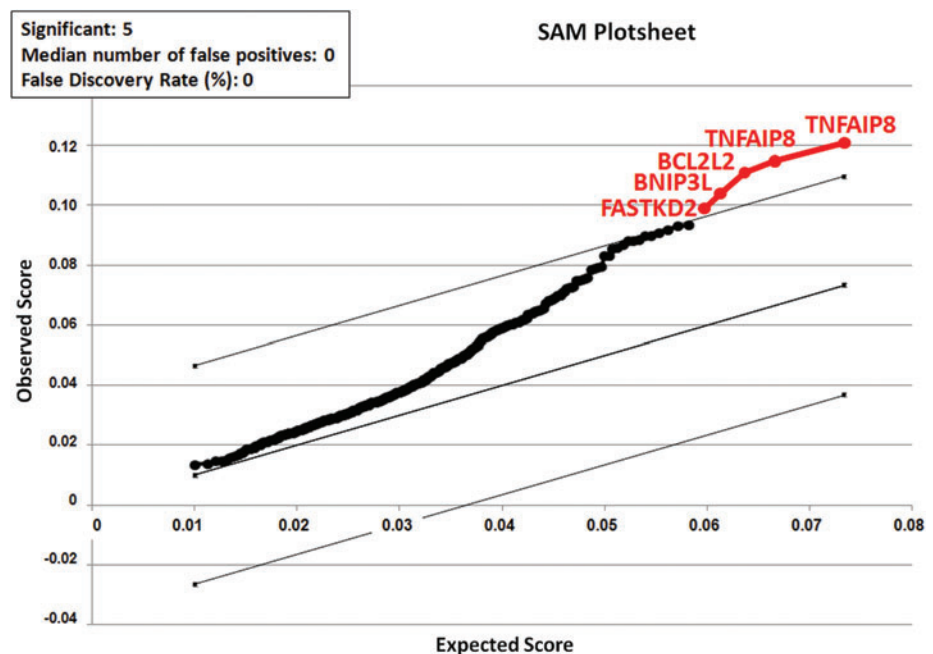
engineering, including good proliferation rate in adherent cell culture; high differentiation capability to osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lineages over multiple cell passages; and, as previously reported,¹ the expression of several markers of undifferentiated MSC (*CD105*, *CD103*, and *CD90*) and the nonexpression of *CD45*, among other markers.³² These results confirm that the cultured cells were HWJSCs and indicate that our cultured HWJSCs may be clinically useful at the 10 cell passages analyzed.

A critical factor influencing the clinical outcomes of cell therapy/transplantation procedures and the success of tissue engineering is the viability and proliferative capacity of the cells used.³⁷⁻⁴⁰ However, no fully sensitive and specific method has yet been established that evaluates the cell viability of human MSCs before their application in these contexts. It should also be taken into account that cell cultures tend to age and lose viability after several passages in culture.¹⁰ Thus, evident morphological changes were recently described in corneal endothelial cell cultures from the fourth passage onward, with a trend for cell enlargement, cell growth alterations, and a higher percentage of cell death with increasing passage number.⁴¹ However, no data are available on specific intracellular changes in HWJSCs kept in culture for several passages, and little is known about the influence of sequential subculturing on the cell viability and proliferation capabilities of cultured HWJSCs.

In this study, we used classical (trypan blue exclusion) and novel highly sensitive techniques (electron-probe X-ray microanalysis, calcein AM and ethidium homodimer-1, WST-1, microarray, and RTCA) to determine cell viability and cell proliferation. The highest ACVL was observed at the sixth passage, although high cell viability levels were also found at the first, fifth, and seventh passages. No significant change in proliferative capability was observed at any of the 10 cell passages analyzed. A high correlation was found among the techniques used in this study, contrasting with the poor correlation previously observed between trypan blue and electron-probe X-ray microanalysis results for cell viability levels in corneal endothelial cells⁹ and vascular endothelium.¹⁰ The fact that HWJSCs are more undifferentiated than adult endothelial cells and have a higher stemness potential may account for this closer correlation.

Electron-probe X-ray microanalysis allows both qualitative and quantitative determinations of the ionic elements that play a role in cell viability. This approach permits the accurate determination of cell viability and the identification of mechanisms underlying the cell death found at given cell

FIG. 5. Significance Analysis of Microarrays (SAM) results for all genes with a role in apoptotic cell death using multiclass analysis of genes associated with the average cell viability levels (ACVLs). All differentially expressed probe sets are represented in red color, and their names are shown in the plot. We used a δ value that permitted a false discovery rate of 0. Color images available online at www.liebertonline.com/tec



passages.^{13–18} Although it is clear that most physiological cell functions require a close control of intracellular levels of P, S, Cl, Ca, and other ions, no data have been published on the physiological concentrations of these elements in human native umbilical cords or cultured HWJSCs.

According to the K/Na ratios observed in our study, the highest cell viability levels were at the fifth and sixth passages, which also showed elevated cell proliferation rates. Intracellular concentrations of Na and K are known to be excellent markers of cell viability, and the K/Na ratio is one of the most powerful microanalytical indicators of cell damage.^{14,18,42} Decreased cell viability at the second, third, and seventh passages may be apoptosis related, given the significantly reduced intracellular levels of Cl in these subcultures, whereas the decrease at passages 8, 9, and 10 may be necrosis related, because elevated Cl concentrations were found in the corresponding subcultures. The high Cl concentration at passage 1 may be associated with a necrosis-related increase in mortality, which could result from the cell isolation process and cell adaptation to the culture conditions. A typical pattern of increased Na and depleted K and Cl is well documented in cells undergoing death by apoptosis.¹⁹ Various authors have found an early decrease in K and Cl to be an early predictor of apoptosis, reporting that the decrease in Cl may be the more important of the two and may be used to predict early cell damage.¹⁶ Hence, our findings are compatible with reports on ionic changes in preapoptotic cells and suggest that HWJSCs at the second, third, and seventh passages should not be used for clinical purposes because of the number undergoing cell death in the corresponding subcultures. HWJSCs at the eighth, ninth, and tenth passages also showed low viability levels and may not be suitable for human cell therapy and tissue engineering.

Our analysis of the other major intracellular elements revealed an initial decrease in Mg and P between the first and the second cell passage that was statistically significant for P, followed by a progressive increase in both elements until a significant decrease after the seventh passage. According to previous reports,^{9,43} these findings may be associated with an initial reduction in the intracellular concentration of ATP that would normalize over successive cell passages and then decrease at passages 8, 9, and 10, when cells may be entering senescence. Our observation of a significant increase in intracellular S concentration at the sixth cell passage is consistent with an increase in sulfated glycosaminoglycans at this passage, when the cell viability is higher, confirming the good functional status of HWJSCs in this subculture.⁴⁴ Intracellular Ca levels were initially elevated but normalized after the fourth cell passage, when a significant decrease in Ca coincided with an increase in ACVL; Ca levels significantly increased between the seventh and tenth passages, when there was a decrease in ACVL. These results are consistent with the known increase in intracellular Ca levels in response to cell damage and apoptosis.^{45,46}

We identified some of the genes that may be responsible for the differences that have just been mentioned with regard to cell viability among HWJSC passages. SAM analysis results demonstrated that the ACVL was significantly associated with four genes related to apoptotic activity. Two are apoptosis-inhibitor genes, *BCL2L2* and *TNFAIP8*, and the latter has two different probe sets. *BCL2L2* (GO:0006916: anti-apoptosis and GO:0042981: regulation of apoptosis) is a

member of the BCL-2 apoptotic inhibitor gene family, whose anti-apoptotic effects have been demonstrated in various human cells and tumors.⁴⁷ *TNFAIP8* belongs to the tumor-necrosis-factor gene family, which plays a role in the control of cell viability and cell death (GO:0006916: anti-apoptosis, GO:0006915: apoptosis, GO:0019987: negative regulation of anti-apoptosis and GO:0043027: caspase inhibitor activity), and the protein can be induced by TNF- α and other apoptotic factors.⁴⁸ The significant association of the expression of these anti-apoptotic genes with cell viability may explain some of the cell viability changes found in the first 10 consecutive passages of these cells. The combined action of these genes may be responsible for the high cell viability found at passages 5 and 6. The other two apoptosis-related genes associated with the ACVL were the pro-apoptotic genes *BNIP3L* and *FASTKD2*. The mitochondrial protein *BNIP3L* (GO:0006917: induction of apoptosis and GO:0043066: negative regulation of apoptosis) is known to induce apoptosis and cell growth arrest in transfected cells.⁴⁹ Likewise, *FASTKD2* (GO:0006915: apoptosis) may play a role in the regulation of mitochondrial apoptosis, given that *FASTKD2* knockdown prevented apoptosis of breast cancer cells in an *ex vivo* model of apoptosis.⁵⁰ Taken together, all of the results just mentioned suggest that a complex equilibrium of pro- and anti-apoptotic gene signals may drive cell death and senescence during sequential HWJSC subculture. These results are in agreement with electron-probe X-ray microanalysis findings on the preapoptotic distribution of intracellular elements in these cells.

Interestingly, all gene functions that were overrepresented among the genes positively correlated with ACVL corresponded to the synthesis and turnover of cellular components. It appears that cells with the highest cell viability levels (especially at fifth and sixth passages) activate multiple cell processes associated with protein synthesis, cell growth, and proliferation, although the differences in cell proliferation among the 10 cell passages did not reach statistical significance. The activation of these gene functions in cell passages with high cell viability confirms the good metabolic status of HWJSCs at these passages. It should be taken into account that the cell viability may have been influenced by our study conditions (e.g., trypsin concentration, cell confluence level, etc.), and results may vary under different conditions.

In summary, these results support the utilization of the highly sensitive methods described in this study for the analysis of all cells selected for clinical purposes in order to determine their vital status and ensure an adequate *in vivo* survival rate. In general, our data indicate that the highest cell viability levels correspond to the fifth and sixth HWJSC passages, suggesting that these passages should be preferentially used in cell therapy or tissue engineering protocols.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) from the National Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grant FIS 08/615 and by Junta de Andalucía, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, grant P10-CTS-6060 (proyectos de excelencia). The authors are grateful to Richard Davies for assistance with the English version.

Disclosure Statement

There is no conflict of interest for any of the authors. No competing financial interests exist.

References

- Alaminos, M., Perez-Kohler, B., Garzon, I., Garcia-Honduvilla, N., Romero, B., Campos, A., and Bujan, J. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **223**, 640, 2010.
- Weiss, M.L., and Troyer, D.L. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* **2**, 155, 2006.
- Wu, K.H., Zhou, B., Lu, S.H., Feng, B., Yang, S.G., Du, W.T., Gu, D.S., Han, Z.C., and Liu, Y. L. *In vitro* and *in vivo* differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* **100**, 608, 2007.
- Chang, Y.S., Oh, W., Choi, S.J., Sung, D.K., Kim, S.Y., Choi, E.Y., Kang, S., Jin, H.J., Yang, Y.S., and Park, W.S. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplant* **18**, 869, 2009.
- Can, A., and Karahuseyinoglu, S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* **25**, 2886, 2007.
- Mitchell, S.L., and Niklason, L.E. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol* **12**, 59, 2003.
- Lund, R.D., Wang, S., Lu, B., Girman, S., Holmes, T., Sauve, Y., Messina, D.J., Harris, I.R., Kihm, A.J., Harmon, A.M., Chin, F.Y., Gosiewska, A., and Mistry, S.K. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* **25**, 602, 2007.
- Troyer, D.L., and Weiss, M.L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* **26**, 591, 2008.
- Alaminos, M., Sanchez-Quevedo, M.C., Muñoz-Avila, J.I., Garcia, J.M., Crespo, P.V., Gonzalez-Andrades, M., and Campos, A. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol* **211**, 692, 2007.
- Rodriguez-Morata, A., Garzon, I., Alaminos, M., Garcia-Honduvilla, N., Sanchez-Quevedo, M.C., Bujan, J., and Campos, A. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg* **22**, 440, 2008.
- Bilic, G., Zeisberger, S.M., Mallik, A.S., Zimmermann, R., and Zisch, A.H. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant* **17**, 955, 2008.
- Solomon, M., Wofford, J., Johnson, C., Regan, D., and Creer, M.H. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion* **50**, 820, 2010.
- Roomans, G.M. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater* **3**, 1, 2002.
- Salido, M., Vilches, J., and Roomans, G.M. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int* **28**, 397, 2004.
- Warley, A. Potassium concentration is reduced in cultured rabbit tracheal smooth muscle cells after withdrawal of serum. *Cell Biol Int* **25**, 691, 2001.
- Zierold, K. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* **144**, 70, 1997.
- Vilches, J., Salido, M., Fernandez-Segura, E., and Roomans, G.M. Neuropeptides, apoptosis and ion changes in prostate cancer. Methods of study and recent developments. *Histol Histopathol* **19**, 951, 2004.
- Warley, A., Fernandez-Segura, E., Lopez-Escamez, J.A., and Campos, A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int* **18**, 915, 1994.
- Fernandez-Segura, E., Canizares, F.J., Cubero, M.A., Warley, A., and Campos, A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* **253**, 454, 1999.
- Fernandez-Segura, E., Canizares, F.J., Cubero, M.A., Revelles, F., and Campos, A. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* **21**, 665, 1997.
- Sanchez-Quevedo, M.C., Alaminos, M., Capitan, L.M., Moreu, G., Garzon, I., Crespo, P.V., and Campos, A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol* **22**, 631, 2007.
- Gress, T.M., Hoheisel, J.D., Lennon, G.G., Zehetner, G., and Lehrach, H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* **3**, 609, 1992.
- Iqbal, J., Liu, Z., Deffenbacher, K., and Chan, W.C. Gene expression profiling in lymphoma diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 191, 2009.
- Gill, R.T. Enabling inverse metabolic engineering through genomics. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 484, 2003.
- Jaluria, P., Chu, C., Betenbaugh, M., and Shiloach, J. Cells by design: a mini-review of targeting cell engineering using DNA microarrays. *Mol Biotechnol* **39**, 105, 2008.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467, 1995.
- Alaminos, M., Gonzalez-Andrades, M., Muñoz-Avila, J.I., Garzon, I., Sanchez-Quevedo, M.C., and Campos, A. Volumetric and ionic regulation during the *in vitro* development of a corneal endothelial barrier. *Exp Eye Res* **86**, 758, 2008.
- Boekstein, A., Kuijpers, G.A., Stols, A.L., and Stadhouders, A.M. Elemental analysis of individual rat blood platelets by electron probe X-ray microanalysis using a direct quantification method. *Histochemistry* **82**, 257, 1985.
- Warley, A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc* **157**, 135, 1990.
- Rodriguez, I.A., Fernández-Segura, E., Ceballos, G., Arrebola, F., Sánchez-Quevedo, M.C., and Campos, A. Hybrid cell death induced by exposure to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): an ultrastructural and X-ray microanalytical study. *J Adhes Dent* **10**, 105, 2008.
- Nieto-Aguilar, R., Serrato, D., Garzon, I., Campos, A., and Alaminos, M. Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin-agarose scaffold. *J Biomater Appl* **25**, 743, 2011.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315, 2006.

33. Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**, 3448, 2005.
34. Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A., and Jaenisch, R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349, 2006.
35. Prasanna, S.J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S.R., and Vasanadan, A.B. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* **5**, 9016, 2010.
36. Weiss, M.L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K.B., Weiss, R.J., VanderWerff, I., Troyer, D., and McIntosh, K.R. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* **26**, 2865, 2008.
37. Alaminos, M., Del Carmen Sanchez-Quevedo, M., Muñoz-Avila, J.I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., and Campos, A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3311, 2006.
38. Garzon, I., Sanchez-Quevedo, M.C., Moreu, G., Gonzalez-Jaranay, M., Gonzalez-Andrades, M., Montalvo, A., Campos, A., and Alaminos, M. *In vitro* and *in vivo* cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontol Res* **44**, 588, 2009.
39. Garzon, I., Serrato, D., Roda, O., Del Carmen Sanchez-Quevedo, M., Gonzales-Jaranay, M., Moreu, G., Nieto-Aguilar, R., Alaminos, M., and Campos, A. *In vitro* cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering. *Int J Artif Organs* **32**, 711, 2009.
40. Gonzalez-Andrades, M., Garzon, I., Gascon, M.I., Muñoz-Avila, J.I., Sanchez-Quevedo, M.C., Campos, A., and Alaminos, M. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med* **3**, 442, 2009.
41. Zhu, C., and Joyce, N.C. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1743, 2004.
42. Roomans, G.M. Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* **10**, 1, 2001.
43. Di Francesco, A., Desnoyer, R.W., Covacci, V., Wolf, F.I., Romani, A., Cittadini, A., and Bond, M. Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* **360**, 149, 1998.
44. Roomans, G.M. X-ray microanalysis of epithelial cells in culture. *Methods Mol Biol* **188**, 273, 2002.
45. Berger, M.L., Reynolds, R.C., Hagler, H.K., Bellotto, D., Parsons, D., Mulligan, K.J., and Buja, L.M. Anoxic hepatocyte injury: role of reversible changes in elemental content and distribution. *Hepatology* **9**, 219, 1989.
46. Roomans, G.M., and Von Euler, A. X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *Cell Biol Int* **20**, 103, 1996.
47. Sasi, N., Hwang, M., Jaboin, J., Csiki, I., and Lu, B. Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. *Mol Cancer Ther* **8**, 1421, 2009.
48. Kumar, D., Whiteside, T.L., and Kasid, U. Identification of a novel tumor necrosis factor- α -inducible gene, SCC-S2, containing the consensus sequence of a death effector domain of fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein. *J Biol Chem* **275**, 2973, 2000.
49. Yasuda, M., Han, J.W., Dionne, C.A., Boyd, J.M., and Chinnadurai, G. BNIP3 α : a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Res* **1**, 533, 1999.
50. Yeung, K.T., Das, S., Zhang, J., Lomniczi, A., Ojeda, S.R., Xu, C.F., Neubert, T.A., and Samuels, H.H. A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2. *Mol Cell Biol* **31**, 2287, 2011

Address correspondence to:

Miguel Alaminos, M.D., Ph.D., B.Sc., Ph.D.

Department of Histology (Tissue Engineering Group)

Faculty of Medicine

University of Granada

Avenida de Madrid 11

Granada E18012

Spain

E-mail: malaminos@ugr.es

Received: September 8, 2011

Accepted: December 13, 2011

Online Publication Date: January 26, 2012