

7. Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica

DAMIÁN GARCÍA OLMO Y MARIANO GARCÍA ARRANZ

RESUMEN

La primera vez que se describió la existencia de células progenitoras en el tejido adiposo subcutáneo fue en el año 2001. Se comunicó la existencia de un grupo de células homogéneas con aspecto fibroblástico, obtenidas a partir de la fracción vásculo-estromal de tejido adiposo extraído por liposucción, que tenían la capacidad de diferenciarse a osteocitos, condriocitos y adipocitos. En el año 2004 fueron definidas como ASC (*Adipose-derived Stem Cells*) y se establecieron los criterios de identificación: 1. Células con morfología fusiforme que se aíslan mediante digestión enzimática y adhesión a los plásticos. 2. Con capacidad de autorrenovación por largos periodos de tiempo. 3. Multipotenciales (se diferencian a adipocitos, condrocitos y osteocitos) y 4. Que tienen el siguiente perfil de expresión: marcaje positivo para CD29, CD44, CD 90 y CD105; y un marcaje negativo para CD34, CD45 y CD133.

Se han descrito más de doscientos ciclos de replicación *ex vivo* de las ASC sin alteraciones genéticas o fenotípicas. En los últimos años se ha observado la expresión de marcadores de células madre embrionarias en la superficie de las ASC (Oct-4, Rex-1 y Sox-2). También se han descrito algunas vías de señalización, que regulan la proliferación y/o la diferenciación celular (Wnt, Esfingosilfosforilcolina y FGF-2). También se ha comunicado diferenciación a músculo esquelético y cardiaco, tejido neuronal, endotelio vascular, epitelio, tejido hepático y tejido pancreático. Lo que propone a las ASCs como una de las células más prometedoras para su uso en terapia celular.

A pesar de todos los estudios realizados hasta ahora, los procesos biológicos sobre los que actúan las ASC no son completamente conocidos. Además de su capacidad de diferenciación, se ha comprobado que las ASC son capaces de estimular los propios mecanismos endógenos de reparación de los tejidos. El mecanismo de acción podría estar asociado a su capacidad inmunomoduladora, inhibiendo los procesos inflamatorios, lo cual nos llevaría a mejorar el proceso de la reparación de los tejidos. Este efecto antiinflamatorio hace que se esté evaluando la posibilidad de utilizarlas en la enfermedad de injerto contra huésped o en patologías inflamatorias (artritis reumatoide, colitis intestinal). Existe un gran número de estudios que han demostrado la capacidad de las ASC de reparar daños en tejidos *in vivo*. Entre ellos hay que destacar los encaminados a reparaciones óseas y cartilaginosas. Muchos de estos estudios están sirviendo para probar nuevos biomateriales que puedan usarse en la clínica como soporte para la reparación de huesos.

Hemos identificado 12 ensayos clínicos que utilizan como fuente terapéutica ASC. Entre las patologías objeto de estos ensayos clínicos, se incluyen las derivadas de patologías vasculares, tratamientos para la diabetes y el tratamiento para la patología fistulosa. Estos usos clínicos están basados en la plasticidad de las células mesenquimales y su potencial poder antiinflamatorio e inmunomodulador. Los mejores resultados se están consiguiendo en cicatrización. Los resultados definitivos de los diferentes ensayos clínicos se conocerán en los próximos años y posiblemente podamos ver realidades clínicas que se intuyeron hace diez años en los laboratorios de investigación básica.

ABSTRACT

Progenitor cells in the subcutaneous fat were first described in 2001. It was reported the existence of a homogeneous group of cells, like fibroblasts, obtained from the stromal-vascular fraction of adipose tissue removed by liposuction, with ability to differentiate into osteocytes, chondrocytes and adipocytes. In 2004, these cells were defined as ASCs (Adipose-derived Stem Cells) and the criteria for identification was set: 1. cells with spindle morphology that were isolated by enzymatic digestion and adherence to plastic. 2. capacity of self-renewel for long pe-

riods of time. 3. Multipotential (they could differentiate to adipocytes, chondrocytes and osteocytes) and 4. Showing a expression profile: CD29 CD44, CD90 and CD105 positive marking, and CD34, CD45 and CD133 negative marking.

It has been described more than two hundred cycles of *ex vivo* replication of the ASCs without genetic or phenotypic alteration. In recent years, expression of embryonic stem cells markers on the surface of the ASCs (Oct-4, Rex-1 and Sox-2) has been observed. Furthermore, some signaling pathways that regulate the proliferation and / or cell differentiation (Wnt, Sphingophosphorilcoline and FGF-2) have been described. It is reported that ASC are also able to differentiate into cardiac and skeletal muscle, neuronal tissue, vascular endothelium, epithelium, liver tissue and pancreatic tissue. These are some of the evidences that makes this type of cells one of the most promising cells in cell therapy.

Being conducted all these studies, the biological processes on which the ASCs participate are not completely known so far. Besides their capacity for differentiation, it appears that the ASCs are able to stimulate endogenous mechanisms of tissue repair. This mechanism of action could be associated with its immunomodulatory capabilities and inhibiting inflammatory processes, which would lead us to improve the process of tissue repair. Nowadays it is being evaluated the possibility of using these cells in the graft versus host disease or inflammatory diseases (rheumatoid arthritis, intestinal colitis) due to its anti-inflammatory effect. There are several studies which demonstrate the ability of ASCs to repair damaged tissues *in vivo*. Amongst them, it is worth highlighting those research lines which are focused on the bone and cartilage repair. Many of these studies are testing new biomaterials that could be used in the clinic as a support for the repair of bones.

We have identified 12 clinical trials using therapeutic ASCs. Vascular diseases, treatments for diabetes and treatment for fistulizing disease are some of the target diseases. These clinical applications are based on the plasticity of mesenchymal cells and their potential anti-inflammatory and immunomodulatory capability. The best results are achieved in healing. The final results of these different trials will be announced in the coming years and we could see as a clinical reality what was thought in the basic research laboratories 10 years ago.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, estudios de diferentes grupos de investigación han identificado varias fuentes de células progenitoras, las cuales se reconocen por su capacidad de autorrenovación y su potencial de diferenciación a diferentes estirpes celulares. Hoy en día se acepta la existencia de células que cumplen ambas premisas en casi todos o todos los órganos de los individuos adultos. La función de estas células parece estar relacionada con la renovación de las células que mueren en los tejidos adultos (1), así como con la reparación de pequeñas lesiones que se producen constantemente en los órganos adultos. Dentro de este grupo de células, las más conocidas por la comunidad científica y clínica son las células residentes en la médula ósea. Las células progenitoras de la médula ósea se han clasificado en relación a su principal función en precursores hematopoyéticos y en células que anidan en el estroma de la médula, también llamadas células mesenquimales por su origen embrionario, ya que se derivan de la lámina mesotelial del embrión.

Durante los últimos años, se han encontrado células similares a las mesenquimales de la médula ósea en numerosos órganos adultos como en el tejido adiposo (3), en la pulpa dental (4), en la sangre del cordón umbilical (5), en tejidos fetales (6-7), en tejidos placentarios (8-9) y en el líquido amniótico (10) y un largo etcétera. Las células mesenquimales fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1976 (2) a partir de extractos de médula ósea adulta; las describió como unas células que se adherían al plástico, capaces de ser cultivadas durante tiempo indefinido sin modificar su fenotipo y que se podían derivar a células de tejidos mesenquimales como óseas, cartílago, músculo, tendón, grasa y estroma medular. Además, numerosos autores han comprobado que, al menos *in vitro* se pueden derivar a tejidos derivados de otras láminas embrionarias, dando marcadores y morfología típica de cardiomioblastos (11-13), neuronas o astrocitos (14-17), músculo esquelético (18) e incluso células hepáticas. Si bien es cierto que muchos de estos estudios demuestran la expresión de transcritos y/o proteínas específicos de cada uno de estos tipos celulares, aún no se ha podido demostrar su funcionalidad.

Debido a la amplia distribución y plasticidad de las células mesenquimales, en el individuo adulto, numerosos grupos de investigación se han planteado utilizarlas en Terapia Celular y como vehículo para Te-

rapia Génica. De esta manera se han conseguido importantes avances terapéuticos en diferentes patologías mediante ensayos clínicos para la osteogénesis imperfecta (19), leucodistrofia metacromática y síndrome de Hurler (20), en lo que se refiere a Terapia Génica. En lo referente a Terapia Celular, si miramos en la página del *Clinical Trials.gov*, actualmente existen más de 70 ensayos clínicos que emplean células mesenquimales a nivel mundial.

Debido a la morfología fusiforme de las células mesenquimales así como a la ausencia de marcadores de membrana específicos, la comunidad científica ha decidido que para que una célula mesenquimal sea considerada progenitora debe cumplir tres requisitos bien definidos. El primero de ellos es la capacidad de autorrenovación, es decir, cuando una célula progenitora mesenquimal se divide, al menos una de las células resultantes debe ser idéntica a la célula de la que procede, si bien en algunos casos ambas células hijas son idénticas a la célula de origen. El segundo de ellos es la capacidad de diferenciarse a células de diferentes estirpes mesoteliales (hueso, condrocito, adipocito) y, por último, el tercero de ellos es la existencia y ausencia de un grupo de marcadores de membrana: entre los que deben tener un marcaje positivo están CD9, CD29, CD44, CD51, CD59, CD90, CD105, HLA 1, D7-FIB, y ausencia de: CD34, CD133, HLA-DR. Por lo tanto, una célula progenitora mesenquimal además de adherirse a superficies plásticas debe de cumplir los 3 requisitos anteriormente mencionados durante su cultivo *in vitro*.

CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO

La primera demostración de la existencia de células progenitoras mesenquimales en el estroma del tejido adiposo se produjo en el año 2000. Un grupo de investigadores liderado por Gimble, describieron la capacidad *in vitro* de estas células de diferenciarse a tejidos osteogénicos y mineralizar una matriz extracelular, cuando se las exponía a diferentes factores, demostrando la capacidad multipotencial de las células estromales residentes en el tejido adiposo (21).

A pesar de esto primeros estudios, la primera vez que se consideró la existencia de células progenitoras mesenquimales en el tejido adiposo

subcutáneo fue en el año 2001 cuando el grupo liderado por el Dr. Hedrick (22) describió una población celular multipotencial. Su descripción expresaba la existencia de un grupo de células homogéneas con aspecto fibroblástico, obtenidas a partir de la fracción vasculo-estromal (Figura 1) del tejido adiposo y con capacidad de diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos. A estas células las bautizaron con el nombre de PLA (Processed Lipoaspirated cells, células procesadas del lipoaspirado). Obtuvieron un gran número de células a partir de una pequeña muestra de lipoaspirado, que cultivaron sobre placas de Petri durante bastante tiempo, comprobando que cumplían uno de los requisitos de células progenitoras, la autorrenovación. Además, analizaron el fenotipo de dichas células mediante sus marcadores de membrana y analizaron su cinética de crecimiento; en ambos casos comprobaron que esta población celular cumplía los criterios estipulados para ser consideradas células mesenquimales progenitoras, siendo su fenotipo muy similar al descrito para las células mesenquimales progenitoras de la médula ósea. No obstante, hay que considerar que la existencia de células estromales en el tejido adiposo, aisladas como preadipocitos a partir de la fracción vasculo-estromal, se describió hace más de 30 años

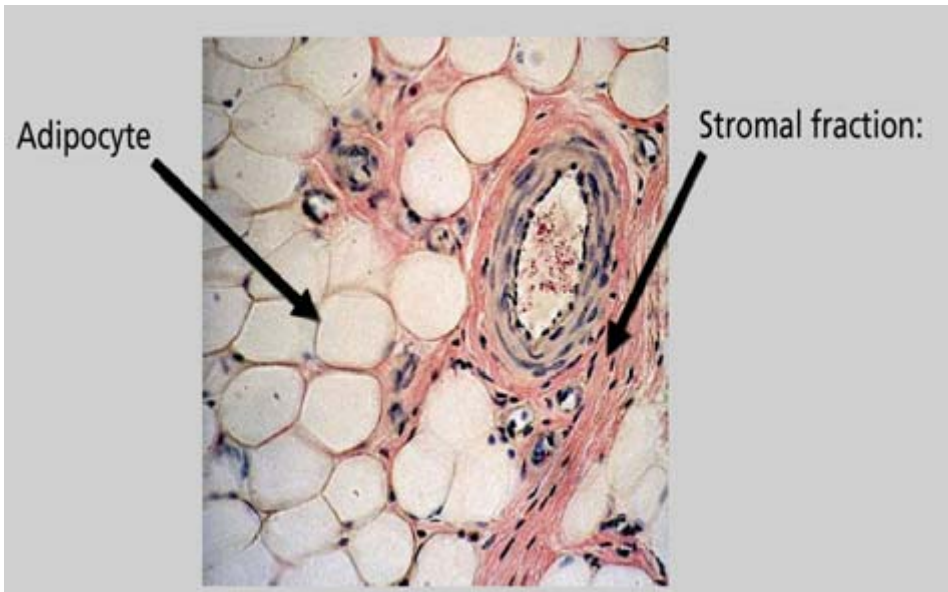


FIGURA 1. Imagen histologica del tejido graso, donde se marcan los posibles nichos de células mesenquimales en la fracción vasculo-estromal.

(23-30). Durante los últimos años, este grupo de células estromales con capacidad de multipotentes ha tenido numerosos nombres en la literatura científica, entre los que podemos destacar: ADAS: *Adipose-Derived Adult Stem cells* (31); ADSC: *Adipose Derived Stem Cells* (32); ATSC: *Adipose Tissue Stem Cells* (33); MADS: *Multipotent Adipose-Derived Stem cells* (34); ASC: *Adipose Stem Cells* (35-37).

En el año 2004, en el Congreso internacional de IFATS (*International Federation for Adipose Therapeutics and Science*) se decidió unificar las diferentes nomenclaturas, dando como acrónimo ASC a las células troncales derivadas de la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo; a pesar de ello, algunos importantes grupos de investigación no han aceptado este consenso y mantienen la nomenclatura anterior (38). Durante esta reunión se sentaron las bases para definir a este tipo de células: Células con morfología fusiforme que se aíslan mediante digestión enzimática y adhesión a los plásticos, de la fracción vascular asociada a los tejidos adiposos de las diferentes especies animales, con capacidad de autorrenovación por largos periodos de tiempo y multipotenciales, ya que se pueden diferenciar a adipocitos, condrocitos y osteocitos. Además, y quizá lo más importante, se dieron un listado de marcadores de membrana celular para identificarlas, ya que no existe hasta ahora un marcador específico para este tipo de células; dentro de este listado de marcadores se propuso que al menos deberían tener un marcaje positivo para CD29, CD44, CD90 y CD105; y un marcaje negativo para CD34, CD45 y CD133.

Como se puede comprobar, la definición de estas células es muy similar a la anteriormente expuesta de las células estromales obtenidas a partir de médula ósea, por ello el tejido adiposo, cada vez más, se considera una fuente alternativa de células estromales multipotenciales frente a la médula ósea u otros tejidos (22, 39). De hecho, el tejido adiposo confiere numerosas ventajas terapéuticas frente a la extracción de células multipotenciales desde la médula ósea. Por ejemplo, para realizar una extracción medular, el paciente debe ser anestesiado por completo para obtener una pequeña cantidad de tejido estromal; por el contrario, para obtener la fracción estromal del tejido adiposo basta con una simple anestesia local y mediante una liposucción se puede obtener una gran cantidad de tejido; en resumen, una mayor cantidad de células con una menor morbilidad para el paciente.

Las ASC se han aislado de humanos y de otras especies de mamíferos mediante liposucción (Figura 2) o mediante biopsias de tejido graso, utilizando un protocolo muy sencillo que implica un tratamiento enzimático y la propiedad de estas células de adherirse a los plásticos usados en los cultivos celulares; en principio, un protocolo similar al empleado para obtener células estromales de la médula ósea. Más concretamente, después de lavar con una solución salina el tejido obtenido y separar la fracción vásculo-estromal por centrifugación, el tejido es digerido mediante colagenasa para obtener células individuales, a continuación se lavan las células con una solución para destruir los restos celulares hematopoyéticos y las células resultantes se añaden a placas de cultivo; pasadas al menos 4 horas (aunque habitualmente se suele dejar toda la noche), se pueden retirar las células que no se han adherido al plástico mediante una simple aspiración del medio de cultivo y añadiendo medio nuevo, para que las células que se han adherido al plástico puedan crecer. Estas células se van replicando y se dejan en la placa de cultivo hasta que se obtie-

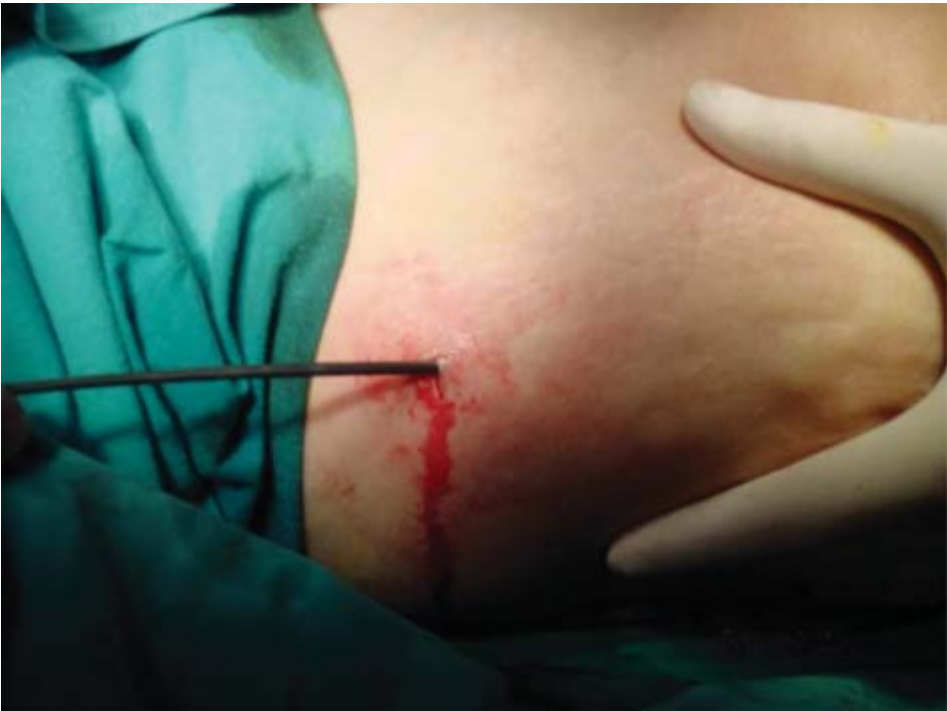


FIGURA 2. *La liposucción como fuente de tejido graso para aislar células progenitoras.*

ne una densidad próxima al 80% de confluencia. Una vez obtenida esta confluencia, las células se despegan de las placas de cultivo mediante tripsina-EDTA o mediante raspado en frío. Se pueden subcultivar y expandir hasta obtener la cantidad que se necesita. Dependiendo de los autores y de la especie animal, se suelen añadir entre 3.000- 5.000 células por cm², cambiando el medio de cultivo, para recuperar los nutrientes utilizados por las células, cada 3-4 días. La composición del medio de cultivo habitual es DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) al que se le añade un 1% de antibióticos y entre un 10-20% de suero fetal bovino, dependiendo de los autores, es decir el mismo medio que se utiliza para las células estromales obtenidas a partir de la médula ósea.

La cantidad de fracción vásculo-estromal que se obtiene depende mucho de la especie animal e incluso dentro de una especie, del donador, así como de la región en la que se hace la liposucción, pero la mayoría de los autores describen para la especie humana, dos millones de células nucleadas por mililitro de lipoaspirado, del cual se pueden llegar a obtener cien mil células adherentes en una semana por mililitro de lipoaspirado. Por lo tanto, la frecuencia de células ASC en la región vásculo-estromal de la grasa subcutánea (5.000 CFU por gr. de tejido adiposo) es significativamente más alta que la cantidad de células estromales que se pueden obtener de la médula ósea (entre 100-1.000 CFU por ml.) (22, 40-42).

Cuando miramos las ASC al microscopio (Figura 3), mantienen una morfología muy similar a otras células de origen mesenquimal, como son los fibroblastos o las células estromales de la médula ósea. Las ASC pueden ser crioconservadas durante largos períodos de tiempo en nitrógeno líquido y mantienen toda su viabilidad, así como sus propiedades biológicas (43).

Algunos autores han descrito más de doscientos ciclos de replicación *ex vivo* de las ASC sin alteraciones genéticas o fenotípicas (40,44-46) y es aceptado por la comunidad científica que estas células tienen una capacidad ilimitada de crecimiento. Se ha demostrado que tardan entre 30 y 120 horas en duplicar su población, dependiendo de dos factores: el donador y la composición del medio de cultivo.

El fenotipo de superficie de las células ASC es muy homogéneo y similar al descrito en las células estromales de médula ósea. Son carac-

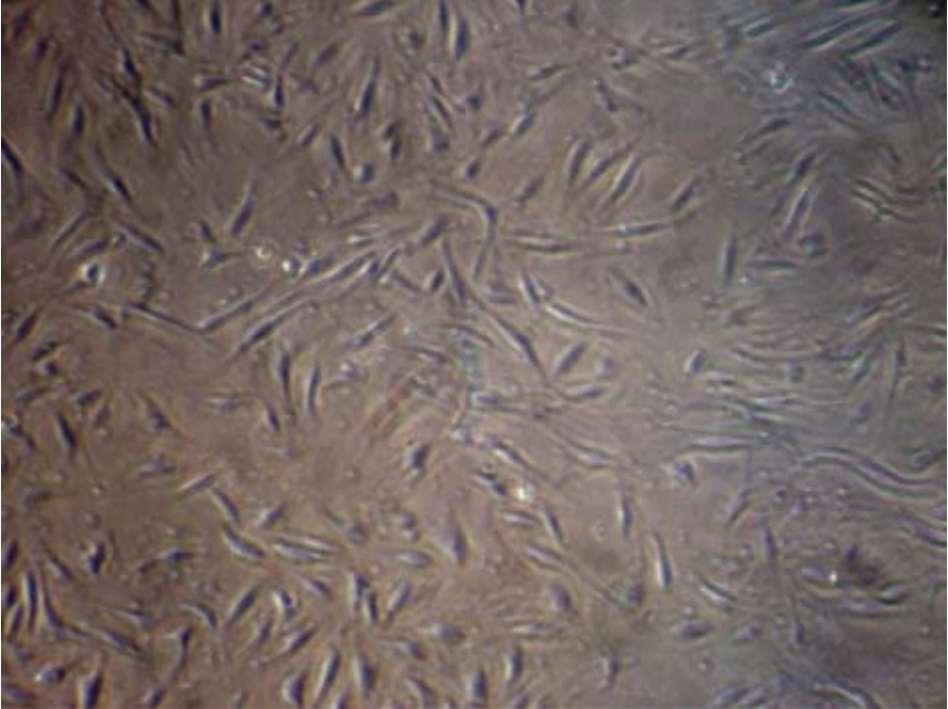


FIGURA 3. *Visión microscópica de las ASC en cultivo.*

terísticas las marcas positivas por densitometría de flujo de: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD90, CD105 y HLA-1; mientras que se incluyen con marcas negativas: CD45, CD11b, CD14, CD31, HLA-2 (37, 42, 46, 49). Actualmente no existe consenso para los marcadores CD34 y CD113 ya que, para algunos autores, son prácticamente negativos, mientras que otros afirman que son positivos por citometría de flujo. CD106 (VCAM-1) es el principal marcador de membrana que diferencia las células estromales derivadas de la médula ósea y las células estromales derivadas del tejido adiposo (50). Cuando uno aísla cualquiera de estos dos tipos de células, inicialmente los marcadores de membrana son muy heterogéneos (49), ya que la población celular aislada es muy diversa, con el paso del tiempo, sobre las placas de cultivo, la población celular se vuelve más homogénea, así como sus marcadores de membrana. Esta homogeneidad de la población se ha comprobado mediante estudios proteómicos y mediante micromatrices (48, 51).

En los últimos años, algunos autores han demostrado la expresión de marcadores de células madre embrionarias en la superficie de las ASC; entre éstos se incluye Oct-4, Rex-1 y Sox-2, durante al menos diez ciclos de replicación (52). También se han descrito algunas vías de señalización, que regulan la proliferación y/o la diferenciación celular de las ASCs, entre éstos están Wnt, Esfingosilfosforilcolina y FGF-2 (52-54).

Otra importante propiedad de las ASC es su capacidad de diferenciación a diversos tipos de célula, como se ha demostrado desde el año 2001 (55). Entre los linajes celulares que se han obtenido a partir de ellas, están: grasa (47, 56), hueso (21, 22, 47, 57-64) cartílago (22, 47, 63, 65-66), músculo esquelético (22,47,68-69), músculo cardíaco (33, 70-72), tejido neuronal (31, 47, 73), endotelio vascular (72, 73-76), epitelio (77), tejido hepático (78) y tejido pancreático (79). Lo que propone a las ASCs como unas de las células más prometedoras para su uso en terapia celular.

Recientemente se ha descrito que las células ASC son tolerogénicas y tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune (80-81). Así mismo su capacidad antinflamatoria puede jugar un papel importante en la reparación de tejidos dañados y en la actividad inmunorreguladora de estos tejidos (82). En resumen, las propiedades biológicas *in vitro* de las ASC son prácticamente idénticas a las células estromales de la médula ósea, lo que sugiere que pueden ser usadas en numerosas estrategias terapéuticas con una menor afectación a los pacientes derivada de su proceso de obtención.

BIOSEGURIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE LA GRASA

Desde que se empezó a hablar de las células madre, surgieron numerosas críticas de diferentes grupos científicos y sociales, debido al temor que provocaban. Estos temores siempre han estado asociados a la posibilidad de neoformaciones de las células madre al inyectarlas en organismos adultos, extrapolando lo que ocurre con las células madre embrionarias, en las que una de sus características principales es la formación de teratomas *in vivo*. Aunque se han desarrollado

infinidad de esfuerzos para intentar llegar a conclusiones, sólo un artículo en la bibliografía científica (83) ha demostrado que las células estromales adultas son capaces de llegar a una fase de senescencia celular tras dos meses en cultivo; estos autores afirman que, cuando algunas de estas células superan esta fase de senescencia, son capaces de transformarse y generar poliploidias en su cariotipo. Ningún laboratorio ha podido reproducir estos experimentos. Otros muchos grupos han intentado protocolos más agresivos para las células, sin lograr conseguir la transformación. Esto nos hace poner en duda estos resultados, a pesar de provenir de uno de los grupos más relevantes dentro de los estudios de bioseguridad sobre células madre adultas. Sirvan como ejemplo los trabajos realizados por nuestro grupo en el Hospital Universitario La Paz, aún pendientes de ser publicados, en los que mantenemos las células durante más de 6 meses en cultivo, sin encontrar ninguna diferencia fenotípica ni cariotípica frente a las ASC recién obtenidas, o los estudios de transformación celular utilizando DNA procedente de tumores, o la inyección de ASC cultivadas en ambiente tumoral sobre ratones inmunodeficientes. En ninguno de los supuestos anteriores hemos obtenido una sola célula transformada (datos sin publicar). Por otro lado, la experimentación con modelos animales muy variados, desde ratones a humanos pasando por primates, conejos, cerdos, ovejas y un largo etcétera, nunca han descrito neoformaciones que pudieran asociarse a la inyección bien local o bien sistémica (a través del torrente sanguíneo) de células estromales adultas provenientes del tejido adiposo o de la médula ósea. Estos resultados derivados de ensayos clínicos o de cirugía experimental, junto con los datos que se van teniendo de la biología molecular y celular, nos permiten afirmar que el uso de células estromales, de cualquier origen, es seguro, a pesar de no conocerse totalmente sus mecanismos de acción una vez inyectadas en los diferentes modelos animales.

CAPACIDAD REPARADORA DE LAS ASCs *IN VIVO*

Desde que se comprobó la similitud entre las ASC y las células estromales de la médula ósea, y teniendo en cuenta la facilidad de obtención de las ASC, se han intensificado los grupos de investigación interesados por el potencial de las ASC. Existe un gran número de

estudios que han demostrado la capacidad de las ASC, de origen murino y humano, de reparar pequeños daños en tejidos *in vivo* (84). Generalmente estos estudios se realizan sobre roedores y han demostrado claramente la capacidad de las ASC de contribuir a la regeneración de tejidos dañados sobre diferentes modelos experimentales. Como podemos suponer, gran parte de estos estudios han estado dirigidos a la reparación y/o regeneración de tejidos derivados de la lámina mesotelial embrionaria; al proceder las ASC de esta misma lámina embrional, parece lógico pensar que sería más fácil su diferenciación o su actuación sobre este tipo de tejidos. Entre ellos hay que destacar la infinidad de artículos encaminados a reparaciones óseas y cartilaginosa (85-93). Muchos de estos estudios están sirviendo para probar nuevos biomateriales que puedan usarse en la clínica como soporte para la reparación de huesos (86, 74-76).

Otros estudios relevantes sobre las posibilidades de las ASC son los basados en su capacidad de diferenciarse a músculo esquelético, lo que está disparando las investigaciones para demostrar su capacidad de reparar daños de fibras musculares tras una isquemia (74-76). En este sentido, otro estudio ha demostrado que las ASC se incorporan a los esfínteres urinarios dañados, dando un fenotipo de músculo liso (41). Es más, hay diversos estudios que inyectan ASCs en animales con daño cerebral y han comprobado que las células, incluso pasadas varias semanas, se incorporan a la región dañada y muestran marcadores neuronales y morfología de neurona, astrocito y oligodendrocito (97).

Durante este último año se está estudiando la capacidad inmunomoduladora de las ASC. En este sentido, la posibilidad de utilizarlas en la enfermedad de injerto contra huésped o en patologías inflamatorias ha abierto una nueva línea de investigación. Se ha comprobado que en modelos animales de inflamación (artritis reumatoide, colitis intestinal) las ASC son capaces de disminuir el proceso inflamatorio, además de controlar la respuesta de las células T (82, 98). Este hecho puede ser muy importante a la hora de intentar conocer los mecanismos de actuación de estas células, así como su potencial terapéutico en el futuro.

A pesar de todos los estudios realizados hasta ahora, los procesos biológicos sobre los que actúan las ASC son desconocidos, aunque sí se han observado sus efectos terapéuticos sobre tejidos dañados. Es reconocido por todo el mundo que las células madre (*stem cells*) tienen una

doble función en el organismo adulto, por un lado regeneran las células que van muriendo en los diferentes tejidos con el paso del tiempo y, por otro lado, reparan pequeñas lesiones de los tejidos. Como mencionamos anteriormente, no conocemos los mecanismos biológicos de actuación de las células madre. En este sentido, la capacidad de diferenciación de las ASC en respuesta a daños en diferentes tejidos, se muestra como un evidente mecanismo de acción de estas células *in vivo*. No obstante, no parece ser el único mecanismo que explique algunos de sus efectos terapéuticos. Además de esta capacidad de diferenciación, se ha comprobado que las ASC son capaces de estimular los propios mecanismos endógenos de reparación de los tejidos; un ejemplo sería la capacidad de promover neovascularización de los tejidos en ratones isquémicos (74-76). Otro posible mecanismo de acción podría estar asociado a su capacidad inmunomoduladora, inhibiendo los procesos inflamatorios, lo cual nos llevaría al proceso normal de la reparación de los tejidos. En resumen, son muchas las opciones que podrían explicar el mecanismo de acción de las ASC y, posiblemente, varias de las opciones propuestas anteriormente e incluso otras que aún desconocemos puedan explicar los efectos terapéuticos que se han observado utilizando células mesenquimales, y más concretamente ASC en los diferentes estudios sobre modelos animales, incluyendo la especie humana.

TERAPIA CELULAR CON ASC: ENSAYOS CLÍNICOS ACTUALES

Como todos los avances en el campo de la ciencia básica, para llegar a ser realidades clínicas es necesario que se prueben bajo las condiciones experimentales que impone la vía de los ensayos clínicos.

Los ensayos clínicos en los países occidentales están sometidos a una estricta regulación y una de sus primeras premisas es dar público conocimiento de que se están realizando. Para ello se inscriben en bases de datos oficiales. Una de las bases de datos más importantes, en las que se incluyen la mayoría de los ensayos clínicos que se realizan en el mundo, es el *Clinical Trials.gov* del Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos. Si realizamos una búsqueda informática de los ensayos clínicos que dicha página tiene registrados actualmente (enero-2009) podemos comprobar que se están desarrollando más de 2.000 ensayos en

terapia celular, dato que nos indica la evolución tan vertiginosa que se está produciendo en este campo, gracias fundamentalmente a la creación de grupos de investigación multidisciplinarios. Hay más de un centenar con células no hematopoyéticas. Si aún queremos concretar más, y buscamos terapias con células mesenquimales, encontramos más de 70. De ellos la mayoría utilizando células derivadas de la médula ósea y 12 relacionados con la grasa (Figura 4). Estos datos son aún más interesantes si los comparamos con los que se realizaban hace tan sólo 7 años: en aquel momento, sólo existía registrado un ensayo clínico que utilizaba células mesenquimales. Es muy comprensible que la gran mayoría de los ensayos clínicos con células madre mesenquimales se realicen con células derivadas de la médula ósea, puesto que se utiliza toda la infraestructura que los servicios de hematología tienen para el trasplante de médula ósea, no obstante, nosotros consideramos que la grasa como fuente celular puede tener ventajas adicionales. En la tabla 1 realizamos una comparación sobre ambas fuentes.

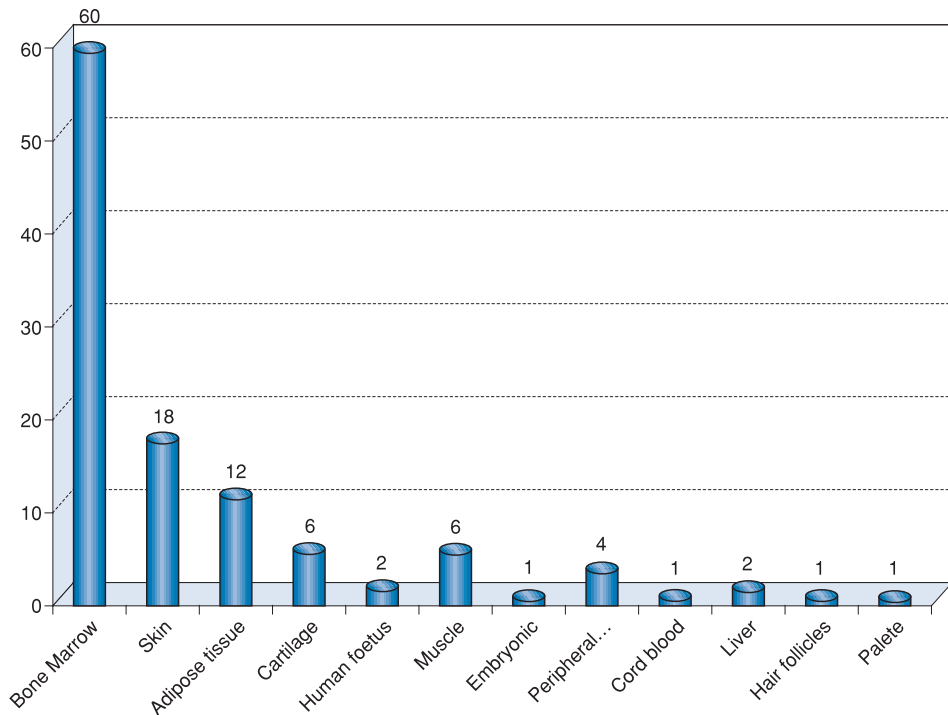


FIGURA 4. Ensayos clínicos con células distintas a las hematopoyéticas.

TABLA 1. Comparación entre MSCs y ASCs en cuanto a sus características como fuente celular para terapia celular humana.

Comparativa entre células madre mesenquimales y derivadas del tejido adiposo como fuente para terapia celular humana.		
	MSCs	ASCs
CANTIDAD TEJIDO DONANTE	Menos abundante	Más abundante
ACCESIBILIDAD	Poco accesible (dentro de hueso)	Muy accesible (subcutáneo)
TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	Precisa anestesia general Asocia más morbilidad	Anestesia local o regional Escasa morbilidad
¿PRECISA MOVILIZACIÓN?	Si, infusión de G-CSF (no exenta de efectos secundarios)	No precisa
RENDIMIENTO (SCs/gramo) DE TEJIDO EXTRAÍDO	Menor efectividad	Mayor efectividad (10-100x rendimiento)
CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS	Misma potencialidad, capacidad replicativa, etc.	Misma potencialidad, capacidad replicativa, etc.

Si nos centramos en los ensayos con ASC, podemos comprobar que de los 12 ensayos clínicos que se están realizando actualmente, 5 se realizan en Europa, 4 en Estados Unidos, 2 en Sudamérica y 2 en el sureste asiático. Entre las patologías más comunes incluidas en estos ensayos clínicos están las derivadas de patologías vasculares, tratamientos para la diabetes y el tratamiento para la patología fistulosa.

Centrándonos en el tipo de patologías tratadas mediante Terapia Celular utilizando como fuente celular las células mesenquimales, debemos clasificarlas según el campo de aplicación:

- Campo cardiovascular, se están realizando ensayos clínicos para tratar el fallo cardiaco. El objetivo es conseguir un nuevo tejido

cardíaco funcionando. Aunque queda mucho por conocer, parece que se aumenta el número de cardiomiocitos, la angiogénesis y se produce un remodelado de la cicatriz. También hay ensayos dirigidos a tratar la enfermedad vascular periférica (99).

- Campo de la Cirugía plástica y reconstructiva, el uso de células mesenquimales en grandes quemados, en lesiones cutáneas secundarias a radioterapia ha demostrado una regeneración epitelial, un aumento de los vasos y una importante hidratación tisular (100).
- Campo de cirugía ortopédica y traumatología, se pretende obtener hueso trasplantable y actualmente son una realidad los ensayos clínicos con niños con osteogénesis imperfecta, obteniéndose osteoblastos funcionantes que aumentan el contenido mineral del hueso (101).
- Campo de la oftalmología, el tratamiento de las úlceras corneales es una realidad y el uso en degeneraciones retinianas empieza a dar sus resultados.
- Campo de cirugía general y digestiva, el tratamiento de las fístulas de distintas localizaciones es una realidad que se lidera desde el Hospital Universitario La Paz (47, 102-103).
- Campo de cirugía torácica, el tratamiento de fístulas del tracto respiratorio está llegando a la clínica con resultados muy prometedores (104).
- Además se están realizando importantes avances en investigación en el campo de la diabetes, de las enfermedades neurodegenerativas y de la regeneración hepática (105).

Resumiendo estos usos clínicos, podríamos afirmar que, dada la plasticidad de las células mesenquimales y su potencial poder regenerador, se está trabajando en numerosos modelos para tratar de sustituir tejidos dañados, sobre todo los considerados clásicamente como permanentes, si bien se ha conseguido principalmente mejorar la cicatrización.

Como colofón final a este capítulo, es importante resaltar que numerosas empresas biofarmacéuticas y biotecnológicas están invirtiendo en el campo de la terapia celular y específicamente en ASC. Esto sin duda

es imprescindible para que los avances del laboratorio lleguen al enfermo y se trata de un claro ejemplo de lo que se ha denominado «investigación traslacional». Los resultados definitivos de los diferentes ensayos clínicos se conocerán en los próximos años y posiblemente podamos ver realidades clínicas que se intuyeron hace diez años en los laboratorios de investigación básica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Verfaillie CM (2002) Adults stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* **12**, 502-508
2. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* **4**, 267-274
3. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedricks MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4279-4295
4. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 5807-5812
5. Lee OK, Kuo TK, Chen WN, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**, 1669-1675.
6. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* **98**, 2396-2402
7. Campagnoli C, Fisk NM, Overton T, Bennett P, Watts T, Roberts I (2000). Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood* **95**, 1967-1972
8. Anker PS, Scherjon SA, Klijburg-van der Keur GM, de Groot-Swings GM (2004) Class FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **22**, 1338-1345
9. Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC (2005) Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* **23**, 3-9
10. Anker PS, Scherjon SA, Klijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willems R, Fibbe WE, Kanhai HH (2003) Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* **102**, 1548-1549
11. Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Peláez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* **164**, 247-256

12. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* **61**, 364-379.
13. Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells (2003) *Clin Exp Med* **3**, 140-149.
14. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM (2002) Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* **174**, 11-20
15. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10711-10716.
16. Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD (2002) Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J. Neurosci* **22**, 6623-6630.
17. Jin HK, Carter JE, Huntley GW, Schuchman EH (2002) Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest* **109**, 1183-1191.
18. Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5'-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**, 1417-1426.
19. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx LC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cells therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 8932-8937.
20. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W (2002) Allogeneic mesenchymal stem cells infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy and Hurler syndrome. *Bone Marrow Transplant* **30**, 215-222.
21. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM (2000) Adipose-derived stromal cells—their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 4**, S41-S44.
22. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, *et al.* (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211-228.
23. Rodbell M, Krishna G (1974) Preparation of isolated fat cells and fat cell «ghosts»; methods for assaying adenylate cyclase activity and levels of cyclic AMP. *Methods Enzymol* **31**(Pt A), 103-14.
24. Van RL, Bayliss CE, Roncari DA (1976) Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest* **58**, 699-704.
25. Van RL, Roncari DA (1977) Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue. *Cell Tissue Res* **181**, 197-203.

26. Van RL, Roncari DA (1978) Complete differentiation of adipocyte precursors. A culture system for studying the cellular nature of adipose tissue. *Cell Tissue Res* **195**, 317-329.
27. Soda R, Tavassoli M (1983) Adipocyte stem cell: a brief review. *Int J Cell Cloning* **1**, 79-84.
28. Pettersson P, Van R, Karlsson M, Bjorntorp P (1985) Adipocyte precursor cells in obese and nonobese humans. *Metabolism* **34**, 808-812.
29. Hauner H, Loffler G (1987) Adipose tissue development: the role of precursor cells and adipogenic factors. Part I: Adipose tissue development and the role of precursor cells. *Klin Wochenschr* **65**, 803-811.
30. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, *et al.* (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* **84**, 1663-1670
31. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, *et al.* (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 371-379.
32. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, *et al.* (2005) Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2542-2547.
33. Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P (2004) Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 420-427.
34. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C (2005) The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* **87**, 125-128.
35. Safford KM, Rice HE (2005) Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Curr Drug Targets* **6** 57-62.
36. Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER (1993) Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem* **268**, 19463-19470.
37. Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM (1999). Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **140**, 3188-3196.
38. Schäffler A, Büchler C (2007) Concise Review: Adipose Tissue-derived Stromal Cells-Basic Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells* **25**, 818-827.
39. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* **189**, 54-63.
40. Aust L, Devlin B, Foster SJ, *et al.* (2004) Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* **6**, 7-14.
41. Jack GS, Almeida FG, Zhang R, Alfonso ZC, Zuk PA, Rodriguez LV (2005) Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract:

- implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol* **174**, 2041-2045.
42. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, *et al.* (2006) Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* **208**, 64-76
 43. Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, Gimble JM, Devireddy RV (2005) Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog* **21**, 1511-1524
 44. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H (2004) Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* **53**, 632-637.
 45. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, *et al.* (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* **8**, 166-177.
 46. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, *et al.* (2006) Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.*
 47. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA (2004) A Phase I Clinical Trial of the Treatment of Crohn's Fistula by Adipose Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Dis Colon and Rectum* **48**, 1416-1423.
 48. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC (2005) Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hA-DAS) cells. *Stem Cells* **23**, 412-423.
 49. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, *et al.* (2006) Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* **24**, 376-385
 50. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, *et al.* Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* **89**, 267-270
 51. DeLany JP, Floyd ZE, Zvonic S, *et al.* Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* **4**, 731-740
 52. Cho HH, Kim YJ, Kim SJ, *et al.* (2006) Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng* **12**, 111-121.
 53. Jeon ES, Song HY, Kim MR, *et al.* (2006) Sphingosylphosphorylcholine induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via activation of JNK. *J Lipid Res* **47**, 653-664.
 54. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C (2006) Autocrine FGF2 signaling is critical for self-renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells* **24**, 2412-19.
 55. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, *et al.* (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* **54**, 132-41

56. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Hyakusoku H, Shimada T (2004) Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice-including relationship of sex differences. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 511-517.
57. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, *et al.* (2001) Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* **7**, 729-741.
58. Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P (2002) Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* **109**, 1033-1041. Discussion 1042-10433.
59. Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC (2003) Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **272**, 398-402.
60. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H (2004) Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 871-877.
61. Hattori H, Sato M, Masuoka K, *et al.* (2004) Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* **178**, 2-12.
62. Kang SK, Putnam L, Dufour J, Ylostalo J, Jung JS, Bunnell BA (2004) Expression of telomerase extends the lifespan and enhances osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells. *Stem Cells* **22**, 1356-1372.
63. Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, Shimada T (2006) Bone marrow regeneration using adipose-derived stem cells. *J Nippon Med Sch* **73**, 45-47.
64. Gabbay JS, Heller JB, Mitchell SA, *et al.* (2006) Osteogenic potentiation of human adipose-derived stem cells in a 3-dimensional matrix. *Ann Plast Surg* **57**, 89-93
65. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 763-769
66. Winter A, Breit S, Parsch D, *et al.* (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* **48**, 418-429.
67. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F (2004) Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* **25**, 3211-3222.
68. Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, *et al.* (2006) Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* **119**, 2945-2952
69. Lee JH, Kemp DM (2006) Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 882-888.
70. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK (2003) Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* **75**, 775-779.

71. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, *et al.* (2004) Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* **94**, 223-229.
72. Fraser JK, Schreiber R, Strem B, *et al.* (2000) Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat Clin Pract Cardiovasc*
73. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE (2004) Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol* **187**, 319-328
74. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, *et al.* (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656-663.
75. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A (2004) Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**, 349-355.
76. Rehman J, Traktuev D, Li J, *et al.* (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292-1298
77. Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P (2005) Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 142-150.
78. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS (2005) Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 258-264.
79. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, *et al.* (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 1135-1140
80. Puissant B, Barreau C, Bourin P, *et al.* (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* **129**, 118-129
81. Rasmusson I (2006) Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **312**, 2169-2179
82. González MA, González-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M (2009). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Colitis by Inhibiting Inflammatory and Autoimmune Responses. *Gastroenterology* **136**, 978-89.
83. Rubio D, García-Castro J, Martín MC, *et al.* (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* **65**, 3035-3039
84. Parker AM, Katz AJ (2006) Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 567-578.
85. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, *et al.* (2003). Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* **21**, 622-629.
86. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, *et al.* (2003) Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* **50**, 610-7.
87. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, *et al.* (2004) Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* **10**, 371-80.

88. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, *et al.* (2004) Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* **32**, 370-3.
89. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, *et al.* (2005) Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng* **11**, 120-129.
90. Zheng B, Cao B, Li G, Huard J (2006) Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation *in vitro* but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation *in vivo*. *Tissue Eng* **12**, 1891-1901.
91. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 763-769.
92. Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH (2003) Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng* **9**, 733-744.
93. Lin Y, Luo E, Chen X, *et al.* (2005) Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and cartilage formation *in vivo*. *J Cell Mol Med* **9**, 929-39.
94. Patrick CW, Jr., Chauvin PB, Hogley J, Reece GP (1999) Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng* **5**, 139-151.
95. von Heimburg D, Zachariah S, Low A, Pallua N (2001) Influence of different biodegradable carriers on the *in vivo* behavior of human adipose precursor cells. *Plast Reconstr Surg* **108**, 411-420. Discussion 421-422.
97. Halbleib M, Skurk T, de Luca C, von Heimburg D, Hauner H (2003) Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acid-based scaffolds. I: *in vitro* differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. *Biomaterials* **24**, 3125-3132.
97. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS (2003) Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* **183**, 355-66.
98. González-Rey E, González MA, Varela N, O'Valle F, Hernández.Cortés P, Rico L, Büscher D, Delgado M. (2009). Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T-cell responses and induce regulatory T-cells *in vitro* in reumatoid arthritis *Ann Rheum Dis.* (en prensa)
99. Schuldt A, Rosen M, Gaudette G, Cohen I (2008) repairing damaged myocardium: evaluating cells used for cardiac regeneration. *Curr Treat Opin Cardiovasc Med* **10**, 59-72.
100. Rigotti G, Marchi A, Galia M, Baroni G, Benati D, Krampera M (2007) Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoastirarte transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* **119**, 1409-1422
101. Dragoo JL, Liebman JR, Lee RS, De Ugarte DA, Lee Y, Zuk PA, Zhu M (2005). Tissue-engineered bone from BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg* **115**, 1665-1673.

102. García-Olmo D, García-Arranz M, Gómez-García L *et al.* (2003) Autologous stem cells transplantation for treatment of recto-vaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell based therapy. *Int J Colorectal Dis* **18**, 451-454
103. García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del Valle E, Zorrila J, García-Arranz M, *et al.* (2009) Expanded adipose derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical Trial. *Dis Colon Rectum* **52**, 79-86.
104. Díaz-Agero P, García-Arranz M, Hristov T, García-Olmo D (2008) A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells: a case report. *Thorax* **63**, 374-6
105. Phinney DG, Prockop DJ (2007) Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of trans-differentiation and modes of tissue repair current views. *Stem Cells* **25**, 2896-2902.