

Trabajo de Fin de Grado

DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A CARDIOMIOCITOS

Autor:

Pablo Fernández Vicente

Director:

Luis Alberto Anel Bernal

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

2019

cres [PHYSIUP]



**Universidad
Zaragoza**

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract.....	1
2. Introducción.....	2
3. Objetivos.....	5
4. Materiales y métodos.....	5
4.1. Sala blanca.....	5
4.2. Preparación de medios y reactivos.....	6
4.3. Procesado de grasa y extracción de células madre mesenquimales.....	6
4.4. Preparación de las ADSCs.....	7
4.5. Diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos.....	8
4.5.1. ADSCs de pase 1.....	8
4.5.2. ADSCs de pase 2.....	9
4.6. Extracción celular.....	9
4.7. ELISA.....	10
4.8. Plasmotest™.....	11
5. Resultados.....	12
5.1. Resultados del Plasmotest™.....	12
5.2. Preparación de las ADSCs.....	13
5.3. Diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos.....	13
5.3.1. ADSCs de pase 1.....	13
5.3.2. ADSCs de pase 2.....	15
5.4. Extracción celular.....	17
5.5. ELISA.....	17
6. Discusión.....	19
7. Conclusiones.....	20
8. Bibliografía.....	21
Anexo.....	23

1. RESUMEN

Resumen: A día de hoy, la enfermedad cardíaca es causante de innumerables muertes por todo el mundo. Ante un ataque de isquemia o infarto, el organismo no es capaz de regenerar el daño causado en el miocardio, como tampoco son capaces los tratamientos convencionales a base de fármacos y cirugías. Es por esto que son necesarias nuevas vías para tratar estos casos de enfermedad cardíaca, teniendo un futuro muy prometedor la terapia con células madre, capaces de diferenciarse y regenerar el tejido dañado. Existen diferentes tipos de células madre, entre ellas las células madre mesenquimales (MSCs), de fácil obtención y con mucha capacidad de diferenciación. Las ADSCs (*adipose-derived stem cells*) son un grupo de MSCs presentes en el tejido adiposo, embebidas en una matriz de tejido conectivo con gran cantidad de tipos celulares que, al digerirse, se puede acceder a ellas. En este estudio se aislaron ADSCs de tejido adiposo y se pusieron en cultivo para diferenciarlas a células musculares cardíacas. Se realizaron tres tratamientos de diferenciación en paralelo, con dos agentes por separado, el kit de diferenciación de la casa comercial StemCell™ y el modificador epigenético 5-azacitidina, así como una combinación de ambos. Las células se caracterizaron mediante la técnica inmunológica de ELISA y, aunque no se han obtenido resultados del todo satisfactorios, queda abierta la puerta a futuras investigaciones que sigan esta línea.

Abstract: Nowadays, heart disease causes countless deaths worldwide. Facing an ischemia or an infarction, our body is not capable of regenerating the damage caused in the myocardium, as neither are conventional treatments based on drugs and surgeries. For this reason, new ways to treat these heart diseases are necessary, with stem cells being a promising therapy, which are capable to differentiate and regenerate damaged tissue. There are different types of stem cells, including mesenchymal stem cells (MSC), which are easy to obtain and with a great capacity for differentiation. ADSC (adipose-derived stem cells) are a group of MSC present in adipose tissue, embedded in a matrix made of connective tissue with multiple cell types that, when digested, can be accessed. In this study, ADSC were isolated from adipose tissue and were cultivated in order to differentiate them to cardiac muscle cells. Three differentiation treatments were performed in parallel, two with StemCell™ commercial differentiation kit and epigenetic modifier 5-azacytidine separately, as well as a combination of both of them. Cells were characterized by immunochemical technique ELISA and, even though the results obtained were not fully satisfactory, the door for future research following this line has been opened.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares afectan al corazón y a los vasos sanguíneos y constituyen la principal causa de muertes en el planeta, siendo principalmente preocupante en países menos desarrollados, donde constituyen hasta el 80% de los casos. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2012 el 30% de las muertes en el mundo fueron causadas por este tipo de enfermedades, de las cuales un 40% fue debido a cardiopatías isquémicas¹.

Las células musculares cardíacas adultas no poseen la capacidad de regenerarse después de un ataque isquémico y la muerte de los cardiomiocitos promueve una cascada que puede terminar con un fallo cardíaco². Existen tratamientos farmacológicos y quirúrgicos capaces de reducir la isquemia en el tejido, sin embargo, ninguno de ellos es capaz de reemplazar ni regenerar el daño causado en el miocardio. Por ello, ante la sospecha de una isquemia miocárdica es necesaria la intervención quirúrgica para limitar el daño causado, utilizando vasodilatadores o estrategias de revascularización. No obstante, no existe un consenso a la hora de los criterios diagnósticos para estos tratamientos³, por lo que por lo que son necesarias nuevas alternativas que permitan reconstruir el tejido dañado para no perder la funcionalidad.

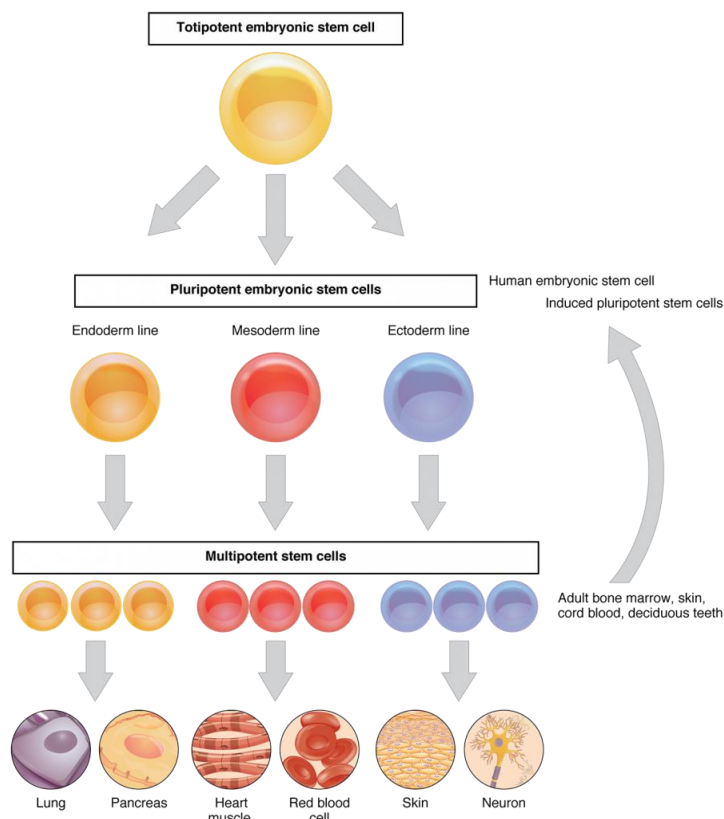


Figura 1. Jerarquía de las células madre con ejemplos de algunos linajes que pueden originar.

Conocemos como células madre a las células con capacidad de multiplicarse y diferenciarse hacia uno o varios tipos celulares, razón por la cual resultan muy atractivas como nuevas terapias. En función de su origen podemos dividir las células madre embrionarias presentes en el embrión, y las células madre adultas, que encontramos en los tejidos de un organismo adulto. Por su potencial de diferenciación podemos clasificarlas en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes⁴.

Células madre totipotentes se denominan a las capaces de generar un

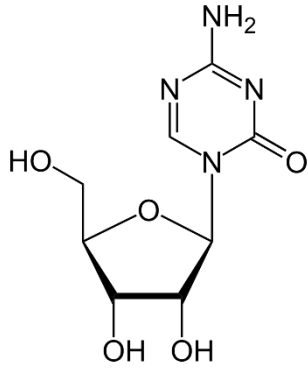
organismo completo, incluyendo los componentes extraembrionarios, y se limitan a las células que componen el cigoto y los blastómeros tempranos^{4,5}. Las pluripotentes son capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular de los tres linajes embrionarios, pero no pueden formar el organismo completo^{4,6}. Las células multipotentes poseen una gran capacidad de diferenciación, aunque ésta se encuentra limitada, ya que no son capaces de generar cualquier tipo celular. Dentro de esta categoría encontramos las células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs). Por último, las unipotentes, también llamadas células progenitoras, únicamente son capaces de generar un tipo celular⁴.

Las MSCs están siendo objeto activo de estudio, ya que su obtención resulta mucho más sencilla que la de células embrionarias. Las MSCs más habituales son las células madre procedentes de médula ósea (*bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BM-MSCs) pero su obtención resulta muy invasiva. Por otra parte, se consiguió aislar células madre de tejido graso⁷ (*adipose-derived stem cells*, ADSC). Estas células guardan muchas similitudes con las BM-MSCs y poseen grandes ventajas: tienen mejor disponibilidad al no ser una técnica tan invasiva, se encuentra una mayor proporción *in situ* y presentan menos problemas éticos que las BM-MSCs⁸.

Dentro del tejido adiposo podemos encontrar una mezcla heterogénea de células, llamada fracción vascular estromal (*Stromal Vascular Fraction*, SVF), rica ADSC y otros tipos celulares y factores de crecimiento. Esta SVF se puede obtener tras el procesado de una muestra de tejido adiposo, que se extrae en quirófano mediante un lipoaspirado (Figura 2). En clínicas CRES se hace uso de esta SVF rica en células madre. Para obtenerla se realiza una digestión enzimática con enzima colagenasa, encargada de romper las fibras de colágeno que mantienen unidas las células adiposas. De esta manera, se libera la SVF y se puede utilizar como tratamiento, en este caso, del dolor articular⁹. Sería de gran utilidad poder disponer de protocolos de diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos con el objeto de poder aplicar estas células como tratamiento de la isquemia cardíaca u otras afectaciones relacionadas con el corazón.

Figura 2. Intervención quirúrgica de extracción de grasa abdominal mediante lipoaspirado. Se observa una jeringa de 60 mL llena con grasa recién extraída en posición vertical, para separar fases y decantar material quirúrgico, restos de células sanguíneas, etc., y obtener una grasa limpia⁹.





En este sentido, se ha reportado en la literatura que el uso de 5-azacitidina (5-AzaC), un inhibidor de la DNA metiltransferasa, es capaz de inducir la diferenciación de células madre embrionarias hacia cardiomiocitos¹⁰. Posteriormente, se investigó si este agente era capaz de inducir la diferenciación de las ADSCs, encontrando resultados contradictorios, lo que deja la puerta abierta a más investigaciones sobre esta posibilidad^{11,12,13}.

Figura 3. Estructura química de 5-azacitidina.

Algunas casas comerciales, como StemCell, han diseñado kits específicos para la diferenciación de las células madre embrionarias a gran cantidad de tipos celulares, entre ellos uno para la obtención de cardiomiocitos¹⁴. Sin embargo, no hay estudios realizados que evidencien si esos kits comerciales podrían funcionar en el caso de células mesenquimales (comunicación privada con representante científico de ventas de StemCell Technologies), por lo que puede resultar interesante valorar esta opción.

En la línea de investigación de la clínica CRES-Phisiup de Zaragoza, se propuso, junto a la Universidad de Zaragoza, el estudio de los cardiomiocitos como modelo para bloquear la necrosis inducida por TNF- α . Para estos futuros ensayos se requiere una fuente de cardiomiocitos, por lo que este trabajo se centra en la obtención de los mismos a partir de células madres mesenquimales presentes en la SVF con el objetivo de conseguir una línea estable de dichas células y poder continuar realizando los estudios pertinentes.

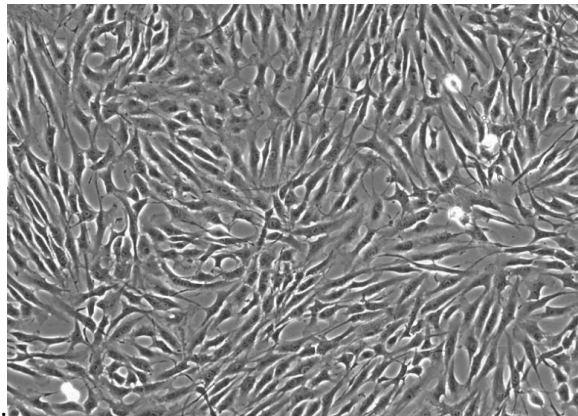


Figura 4. Imagen de microscopía de contraste de fases de cardiomiocitos adultos humanos en cultivo, con aspecto fibroblástico¹⁵.

3. OBJETIVOS

- 1- Aislar en cultivo células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSCs) de la fracción vascular estromal (SVF) procedente de lipoaspirado de grasa abdominal.
- 2- Intentar diferenciar las ADSCs obtenidas a cardiomiocitos utilizando un kit de diferenciación STEMdiff™, diseñado para células embrionarias, y 5-azacitidina, así como una mezcla de ambos tratamientos.
- 3- Estudiar la expresión de proteínas específicas cardiacas como GATA4 y cTnI mediante western-blot y ELISA, respectivamente, como método para determinar el éxito del ensayo.

Para lograr estos objetivos, se desarrolló el siguiente plan de trabajo:

- Procesado del lipoaspirado obtenido en quirófano utilizando enzima colagenasa.
- Cultivo de las células madre mesenquimales y expansión de las mismas en varios pases.
- Proceso de diferenciación de las 3 maneras antes mencionadas:
 - Tratamiento 1: únicamente STEMdiff™
 - Tratamiento 2: mezcla de STEMdiff™ + 5-AzaC
 - Tratamiento 3: únicamente 5-AzaC
- Análisis de las proteínas expresadas por los cardiomiocitos diferenciados *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sala blanca

La realización de este trabajo de investigación se ha llevado a cabo en su totalidad en una sala blanca certificada como clase B, con cabinas de flujo laminar (Biobase, modelo BBS-V1800) de clase A. Todo el material se introduce, previamente lavado con etanol al 70%, a través de un “pass-box” (Biobase, modelo PB-01) situado en un SAS (Sistema de acceso de seguridad) de clase C. Un “pass-box” situado en otro SAS permite la salida del material al exterior. Esta sala blanca fue instalada en 2017 por Fredlab y es validada periódicamente por Qualipharma (última validación 06/02/19). La sala utiliza un sistema de sobrepresiones para evitar la entrada de partículas externas al interior.

El vestuario requerido es de un pijama K2 de tejido SV 105. Recubriendo este pijama, es preciso un mono de protección absoluta PA 100 con tejido UC 114. Ambos tejidos son especiales para zonas de atmósferas controladas y entornos estériles.

4.2. Preparación de medios y reactivos

Se utilizó medio Alpha-MEM Eagle (*Minimum Essential Medium Eagle – alpha modification*, Lonza), suplementado con antibióticos penicilina-estreptomicina (Linus) al 1%, glutamina estable 100x 200 mM (Biowest) al 1%, anfotericina B 100x (Linus) al 0,5%, heparina (Hospira) al 0,25% y UltraGro™ (Helios) al 5%. Previo a su uso, se atemperó estáticamente en un incubador con agitación SH Maxi (CIC Controltecnica).

La casa comercial StemCell nos proporcionó un kit de diferenciación y mantenimiento de células madre embrionarias, con diferentes medios y suplementos para cada uno de ellos. Empezando por el medio basal de diferenciación STEMdiff™, se complementó con 3 suplementos diferentes, llamados suplementos A, B y C, todos ellos 10x. Se descongelaron a temperatura ambiente y se llevaron a una concentración 1x con el medio de diferenciación STEMdiff™. Para futuros usos, se atemperó a temperatura ambiente. En cuanto al medio de mantenimiento basal STEMdiff™, se suplementó con el suplemento de mantenimiento STEMdiff™ 50x, descongelado a temperatura ambiente hasta llevarlo a una concentración 1x. Todos los componentes suplementados contienen material derivado de plasma humano. La preparación de todos estos medios se realizó momentos previos a su primer uso para maximizar su tiempo de vida.

El medio mTeSR™ Plus es un medio sin suero de mantenimiento y expansión de células embrionarias totipotentes y pluripotentes. Se trata de un material requerido en el kit de diferenciación STEMdiff™. El medio basal se completó con suplemento mTeSR™ Plus 5x y se alícuotó en volúmenes de 40 mL. Al no tener suero, el medio contiene FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), necesario para el crecimiento de células madre¹⁶.

Y-27632 es un inhibidor de las ROCK quinasas que compite con el ATP por la unión al centro catalítico. Se ha demostrado que promueve la supervivencia de las células madre embrionarias, ya que impide la apoptosis inducida por la disociación celular¹⁷. El compuesto, fotosensible y suministrado en forma de dihidrocloruro, se llevó a una disolución 10 mM en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y se prepararon alícuotas de 12 µL. De manera análoga, se preparó una disolución stock 10 mM de 5-AzaC (también fotosensible) en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y se prepararon alícuotas de diferentes volúmenes para su conservación.

4.3. Procesado de grasa y extracción de células madre mesenquimales

Cuatro jeringas con 210 mL de grasa abdominal recién extraída se decantaron y trasvasaron a 6 tubos falcon de 50 mL (Greiner bio-one). Se lavó con 20 mL de suero fisiológico (B. Braun) un total de 2 veces y con 15 mL 1 vez y se centrifugó con una centrífuga UNiStation Combi 408 (NeoGenesis) durante 2 min a 178 rfc.

Se eliminaron así los restos de material quirúrgico utilizados y eritrocitos presentes en la muestra al recoger el infranadante con jeringas y agujas espinales con punta tipo Quincke (1,2 x 90 mm). Finalmente, se obtuvo un volumen de 157 mL de grasa limpia. La grasa se procesó con enzima colagenasa (Lyposmol ADSC Enzyme[®]) reconstituida con 20 mL de Ringer-lactato (B. Braun) atemperado previamente a 37 °C. Se emplearon un total de 4 viales de colagenasa. Se agitaron vigorosamente las muestras 2 minutos y se incubaron durante 45 minutos con agitación a 150 rpm. Al terminar, se vorteo durante unos segundos.

La colagenasa se neutralizó con la misma cantidad de medio Alpha-MEM que de enzima utilizada, y se centrifugó 10 min a 712 rfc. El pellet rojizo obtenido corresponde a la SVF. La grasa digerida se eliminó por aspiración con pipeta serológica y finalmente los restos de la interfase con micropipeta de 1000 µL, con puntas con filtro (ClearLine). El medio se eliminó por decantación. La SVF se resuspendió en 1 mL de medio Alpha-MEM, se traspasó a un falcon de 15 mL (Greiner bio-one) y el que se adicionaron 4 mL de tampón de lisis (Zenbio), dejando actuar 5 min para romper los eritrocitos. Tras centrifugación durante 10 min a 563 rfc se consiguió un pellet blanco, que se resuspendió en 3 mL, de los cuales se sembraron 2 frascos de cultivo de 75 cm² (Thermo Scientific) de pase 0, uno con medio Alpha-MEM y otro con medio mTeSR[™] Plus. Se incubaron a 37 °C con 5% CO₂.

4.4. Preparación de las ADSCs

Día 1: Se hizo un cambio de medio a ambos cultivos para eliminar restos de tejido graso y otros grupos celulares presentes en la SVF.

Días 2 y 3: Se controló el crecimiento de ambos cultivos, observándose que el cultivo con medio Alpha-MEM crecía adecuadamente mientras que el cultivo con medio mTeSR[™] Plus no evolucionaba correctamente.

Día 4: El cultivo con medio Alpha-MEM estaba confluyente y se procedió a despegar las células del frasco de cultivo con 1 mL de acutasa (con EDTA 0,5 mM y rojo fenol, de PAN Biotech) incubando 5 minutos a 37 °C con 5% CO₂. Se dieron pequeños golpes laterales para despegar todas las células y se diluyó con 4 mL de Ringer-lactato. Se contaron con un contador automático de células TC 20[™] (Bio-Rad). Se sembraron 6 pocillos en dos placas de 12 pocillos, con ADSCs de pase 1. La primera placa se sembró a 20.000 cél/pocillo, con 1 mL de medio Alpha-MEM. La segunda placa 2 se sembró a 350.000 cél/pocillo, con 1 mL de medio mTeSR[™] Plus. Ambos medios fueron suplementados con 1 µL de Y-27632 10 mM, con una concentración final de 1 µM. También se sembró un frasco de cultivo de 175 cm² con toda la suspensión celular sobrante, a una densidad de 4.000 cél/cm².

Al frasco de cultivo con medio mTeSR™ Plus se le realizó un cambio de medio, sustituyéndolo por medio Alpha-MEM.

Día 6: Se realizó un cambio de medio al frasco de cultivo de 175 cm² de pase 1.

Día 8: Las células se despegaron con 2 mL de acutasa incubando 5 min a 37 °C y 5% CO₂, se diluyó la suspensión con 8 mL de Ringer-lactato, y se contaron. Se sembraron 6 pocillos en otras dos placas de 12 pocillos La placa 3 se sembró a cél/pocillo con medio Alpha-MEM. La placa 4 se sembró a 3,5 x 10⁵ cél/pocillo con medio mTeSR™ Plus. Ambos medios se suplementaron con Y-27632 10 µM. Esta última placa se había tratado previamente con poli-L-lisina. Para esta preparación previa, se preparó una suspensión que, por pocillo, contenía 423 µL de H₂O estéril y 77 µL de poli-L-lisina 0,1 mg/mL. Se incubó 1 h a 37 °C y se lavó dos veces con H₂O estéril.

Los cultivos se fotografiaron cada dos días con una cámara Leica MC 120 HD acoplada al microscopio invertido Leica DMI1.

4.5. Diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos

4.5.1. ADSCs de pase 1

Día -3: Siembra de las dos primeras placas de 12 pocillos como se ha indicado en el apartado 4.4.

Día -1: Cambio de medio en la placa 2 con medio mTeRS™ Plus suplementado una vez más con 10 µM de Y-27632.

Día 0: Diferenciación de la placa 1 con las células a un 95% de confluencia. Se dividió en 3 secciones, cada una diferenciada de las demás en los medios y reactivos utilizados para la diferenciación. Se eliminó el medio Alpha-MEM completo. Para los 2 pocillos superiores se utilizó medio de diferenciación STEMdiff™ A, con un volumen de 2 mL/pocillo. Para los 2 pocillos inferiores se utilizó 2 mL/pocillo de medio Alpha-MEM no completo suplementado con 5-AzaC 10 µM. En los 2 pocillos centrales se utilizó el medio STEMdiff™ A suplementado con 5-AzaC 10 µM. Los medios se mantuvieron durante 2 días.

Día 2: La exposición de las células mesenquimales de la placa 1 al agente 5-AzaC terminó tras este período de tiempo y se realizó entonces un cambio de medio a todos los pocillos. Los superiores, tratados con STEMdiff™ A, y centrales, con STEMdiff™ A + 5-AzaC 10 µM, se sustituyeron por 2 mL de medio de diferenciación STEMdiff™ B, mientras que a los 2 pocillos tratados únicamente con 5-AzaC se les añadió medio Alpha-MEM no completo.

Día 4: Se realizó un cambio de medio en todos los pocillos de la placa 1, esta vez cambiando STEMdiff™ B por STEMdiff™ C en los pocillos correspondientes, y medio Alpha-MEM no completo en aquellos que lo tenían previamente.

Día 6: Se realizó otro cambio de medio, una vez más con STEMdiff™ C los 4 pocillos superiores y con Alpha-MEM los 2 inferiores.

Día 8: Finalización del periodo de diferenciación. A aquellos pocillos con medio de diferenciación STEMdiff™ se les cambió por medio de mantenimiento STEMdiff™, mientras que los restantes se mantuvieron con Alpha-MEM.

En este punto se mantuvieron las células en cultivo con el medio de mantenimiento. Cada 2 días se les cambió el medio, hasta llegar a los 29 días de cultivo, donde excepcionalmente se mantuvo el medio de cultivo durante 3 días. Los días 18, 20 y 22 se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron 10 min a 2.000 rfc y se congelaron a -20 °C.

4.5.2. ADSCs de pase 2

Día -3: Siembra de las placas de 12 pocillos 3 y 4 como se ha indicado en el apartado 4.4.

Días 0, 2, 4, 6, 8...: Diferenciación celular. Utilizando la misma estructura de pocillos que para la placa 1, se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 4.5.1. Se hicieron los mismos cambios de medio y se terminó con el de mantenimiento a los 25 días. En este momento, a días 14, 16 y 18, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron 10 min a 2.000 rfc y se congelaron a -20 °C.

4.6. Extracción celular

Las proteínas cardíacas típicas, como la troponina, actina y miosina cardíaca, son intracelulares. Para poder acceder a ellas y detectarlas, es preciso un método para extraer el contenido citoplasmático. Para ello se utilizó un tampón de extracción de células (Abcam).

El kit de diferenciación STEMdiff™ propone utilizar su reactivo de disociación celular que no utiliza agentes enzimáticos. No obstante, debido a no haberlo utilizado nunca y no conocer realmente su funcionamiento, se utilizaron métodos conocidos para despegar las células en el momento crítico previo a los experimentos con los cardiomiocitos. Las células adherentes presentes en las placas de cultivo de 12 pocillos se despegaron haciendo uso de rasquetas estériles (SPL Life Sciences) con tamaño de espátula de 20 mm, con 1 lavado previo con suero fisiológico. Para otro frasco de cultivo de 75 cm² de un pase superior, mantenido para ser usado como control negativo, se utilizó 1 mL de enzima acutasa, utilizada previamente en el experimento para despegar ADSCs.

Se contaron las células presentes en cada una de las muestras y se centrifugaron 5 min a 500 rfc a temperatura ambiente.

Las pellets celulares se resuspendieron en una solución de tampón de extracción celular 1x, preparado previamente a partir del tampón de extracción 5x y agua desionizada, con una concentración final de 2×10^7 cél/mL. Todas las soluciones se incubaron en hielo durante 20 min. Pasado este tiempo, se centrifugaron durante 20 min a 3.515 rfc, el máximo posible en la centrifuga del laboratorio, no obstante, el protocolo requería 18.000 rfc. Al no disponer la centrifuga de control de temperatura, se añadieron tubos falcon de 50 mL llenos de hielo para intentar mantener una temperatura de 4 °C. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se traspasaron a eppendorfs nuevos, donde se juntaron las alícuotas que compartían el mismo tratamiento recibido para su diferenciación desde ADSCs hasta cardiomiocitos, pasando así de tener 6 muestras a sólo 3, más el control negativo. Finalmente, se congelaron a -80 °C.

4.7. ELISA

Para la determinación de cTnI presente en las muestras se utilizó un kit ELISA SimpleStep® (Abcam). Se trata de un ELISA sándwich que sirve para cuantificar la proteína en cuestión procedente de diferentes fuentes, tales como suero, plasma, sobrenadantes celulares y extractos celulares. En este experimento se ensayaron los dos últimos, procedentes de los sobrenadantes recogidos durante la diferenciación de las células y de los extractos obtenidos en el apartado 4.6.

Los reactivos se prepararon llevando cada uno de los reactivos stock a una concentración 1x con agua desionizada. Estos reactivos son el tampón de lavado y el cóctel de anticuerpos, que incluye anticuerpo de captura y anticuerpo detector. El estándar de cTnI se reconstituyó en 250 µL de tampón de extracción celular 1x, creando la solución estándar stock de 24 ng/mL. 25 µL de la solución stock se añadieron a un tubo con 275 µL de tampón de extracción 1x, llevándolo a una concentración de 2.000 pg/mL. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 hasta llegar al tubo número 7, tal como recoge la figura 5. El 8 se dejó únicamente con el tampón de extracción a modo de blanco.

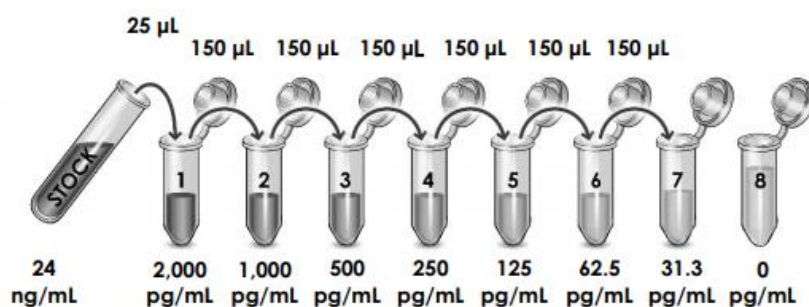


Figura 5. Preparación de los estándares del test ELISA de concentraciones conocidas mediante diluciones seriadas.

Los extractos celulares obtenidos previamente se descongelaron a temperatura ambiente y se diluyeron hasta llegar a un volumen de 50 μ L. Debido al volumen tan pequeño que se obtuvo en la extracción, no se realizan duplicados de las muestras de extractos, razón que podría invalidar el método.

Un total de 36 pocillos se utilizaron en este ensayo, tal como se muestra en la tabla A1 del anexo. En cada uno de ellos se añadieron 50 μ L de estándar/muestra y 50 μ L del cóctel de anticuerpos y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 300 rpm. Tras la incubación, se hicieron 3 lavados con tampón de lavado 1x, eliminando en cada caso los restos de líquido. Seguidamente, con los pocillos secos, se añadieron 100 μ L de solución TMB por pocillo, dejando actuar durante 10 min. La peroxidasa de rábano picante (HRP) cataliza la reacción, generando color azul. Para detener la reacción se añadieron 100 μ L de solución Stop, generando color amarillo. La señal colorimétrica se determinó mediante un lector de placas (BioRad iMark), midiendo la densidad óptica a 450 nm.

4.8. Plasmotest™

Como método para detectar y controlar posibles contaminaciones en los cultivos celulares se utilizó el kit de detección de micoplasmas Plasmotest™, suministrado por InvivoGen. Se trata de un ensayo colorimétrico de control de micoplasmas en los cultivos celulares. Utiliza la habilidad de TLR2 (Toll-like receptor 2) de activar factores de transcripción en presencia de micoplasmas, provocando la secreción de fosfatasa alcalina fácilmente detectable por la coloración azul/morada del medio de detección HEK-blue™. Las células HEK-blue™ proceden de células HEK293 transfectadas con todos los genes necesarios para la cascada de señalización, incluyendo TLR2 junto con una fosfatasa alcalina mejorada para ser secretada, con un promotor inducible por NF- κ B y fosfatasa alcalina-1¹⁸.

El medio de cultivo de las células HEK-blue™ se preparó a base de medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, de Linus) con glucosa, sin L-glutamina y con piruvato sódico, suplementado con UltraGro™ al 5%, normocina™ a 100 μ g/mL (stock a 50 mg/mL) y HEK-blue™ Selection 1x (2 viales de stock 250x). Tanto la normocina™ como el HEK-blue™ Selection son mezclas de varios antibióticos que combinados actúan frente a micoplasmas, bacterias y hongos y garantizan la expresión de los transgenes de las células HEK-blue™.

Para detectar la expresión de la fosfatasa alcalina secretada (sAP) se precisó un medio específico, el HEK-blue™ Detection. Se trata de un medio en polvo que se disuelve en 50 mL de agua estéril y libre de endotoxina. Se filtró por una membrana de 0,22 μ m, se alicuotó en volúmenes de 1 mL y congeló a -20 °C hasta el momento de su uso.

Los controles 10x liofilizados se disolvieron en 1 mL de agua estéril y libre de endotoxina, se diluyeron 1:10, se alicuotaron en volúmenes de 1 mL y se congelaron a -20 °C hasta el momento de su uso. El control positivo no contiene micoplasmas vivos.

El test se llevó a cabo siguiendo los pasos siguientes:

1. Recogida de sobrenadantes de los cultivos celulares, rascando un poco la superficie para obtener células.
2. Calentar las muestras a 100 °C durante 15 min, utilizando un termobloque (Labnet).
3. En una placa de 96 pocillos (Thermo Scientific), añadir 50 µL de cada sobrenadante y de los controles positivo y negativo.
4. Preparar la suspensión de células HEK-blue™ en medio de detección HEK-blue™, a una densidad de 250.000 cél/mL.
Las células crecieron en un frasco de cultivo de 25 cm² (Thermo Scientific) con su medio específico, y al llegar al 70-90% de confluencia, se soltaron con un volumen de 3,5 mL de Ringer-lactato, sin necesidad de tratamiento enzimático. El volumen necesario de suspensión celular se centrifugó a 316 rfc. El pellet se resuspendió en medio de detección HEK-blue™.
5. Añadir 200 µL de suspensión celular a cada pocillo con muestra.
6. Incubar la placa a 37 °C y 5% de CO₂ hasta el día siguiente.

Para analizar los cultivos de este ensayo se recogieron alícuotas de los pases 0 y 1 del cultivo de células madre mesenquimales, sobrenadantes de cada pocillo sin rasgar y rascando la superficie.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados del Plasmotest™

Como se muestra en la figura 6, el ensayo demostró la esterilidad completa de los cultivos, ya que todas las muestras dan color rosáceo, al igual que el control negativo. Esto significa que no existe fosfatasa alcalina secretada por las células HEK-blue™, lo que confirma la ausencia de micoplasmas.

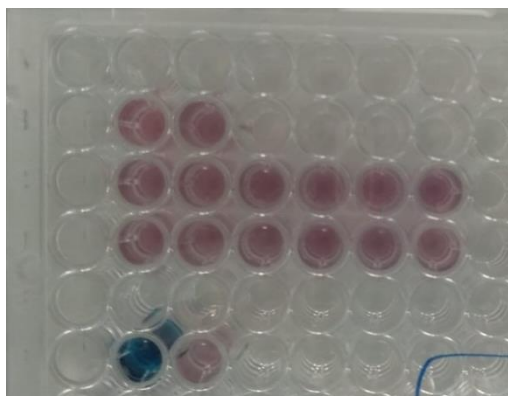


Figura 6. Plasmotest® realizado con muestras de ADSCs de pase 0 y pase 1 (fila B, columnas 2 y 3); sobrenadantes de la placa con tratamientos 1, 2 y 3 (fila C, columnas 2, 3 y 4, respectivamente), y sobrenadantes de la placa 3 con tratamientos 1, 2 y 3 (fila D, columnas 5, 6 y 7, respectivamente); muestras de ADSCs diferenciadas a cardiomiocitos de las placas 1 y 3 siguiendo el mismo esquema que en la fila C; controles positivo (fila F, columna 2) y negativo (fila F, columna 3).

5.2. Preparación de las ADSCs

A día 1, el frasco de cultivo con medio Alpha-MEM tenía muchas células pegadas y con buen aspecto, mientras que el frasco con medio mTeSR™ Plus tenía células pegadas pero en menor cantidad, cosa que se siguió viendo los días siguientes, hasta llegar al día 4, donde la diferencia de crecimiento celular contrasta mucho entre un medio y otro, tal como se observa en las figuras 7A y 7B. Se puede asegurar entonces que el medio completo Alpha-MEM permite la adherencia y el crecimiento de las ADSC con aspecto fibroblástico, mientras que el medio mTeSR™ Plus, diseñado para células embrionarias, es incapaz, en estas condiciones, de promover la adherencia de estas células mesenquimales, formando en cambio agregados de las mismas y adquiriendo un aspecto más redondeado. Por este motivo se intentó rescatar estas células con el medio que sí era eficaz y promovía el crecimiento, Alpha-MEM. El cultivo sembrado con medio Alpha-MEM, crecido hasta la completa confluencia, se digirió con acutasa y se obtuvieron $2,82 \times 10^6$ células, con las que se sembró un frasco de cultivo de 175 cm^2 de pase 1 con medio Alpha-MEM y las placas 1 y 2, con medios Alpha-MEM y mTeSR™ Plus, respectivamente. Para establecer posibles causas de la incapacidad de adherencia y supervivencia en el medio mTeSR™ Plus, la placa se sembró a una densidad conocida, de $3,5 \times 10^5 \text{ cél/cm}^2$, superior a la del cultivo primario a partir de la SVF. De esta manera, se podría comprobar si el efecto de la densidad celular influye a la hora de la adherencia a la superficie de cultivo.

A día 8 se despegaron las células de pase 1 cultivadas en el frasco de 175 cm^2 , obteniendo $6,39 \times 10^6$ células, con lo que se sembró nuevas placas para diferenciar las ADSCs. Las células de pase 0 sembradas inicialmente con medio mTeSR™ Plus y posteriormente cambiado por medio Alpha-MEM mejoraron su crecimiento, pues con el paso de los días aparecían nuevas células, pero cada vez más grandes y anchas, por lo que tras 10 días en cultivo se decidió no continuar con él.

5.3. Diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos

5.3.1. ADSCs de pase 1

Las placas 1 y 2 se sembraron a la vez, cada una con su medio correspondiente. No obstante, sólo la placa 1 se diferenció hacia cardiomiocitos; la placa 2 con medio mTeSR™ Plus siguió sin prosperar a pesar de aumentar la densidad celular respecto al cultivo anterior, como se muestra en las figuras 7C y 7D. Esto implica no un problema de densidad, sino de la afinidad del medio con las células mesenquimales. Por esta razón se descartó el cultivo tras 5 días y se ideó un nuevo ensayo para buscar una forma de conseguir la adherencia con este medio de cultivo. Este ensayo consistió en pretratar una placa de 12 pocillos con poli-L-lisina, que se utilizó para sembrar la placa 4 como se ha indicado en el apartado 4.4. Se eligió este compuesto por favorecer la adhesión de las células en cultivo *in vitro*¹⁹.

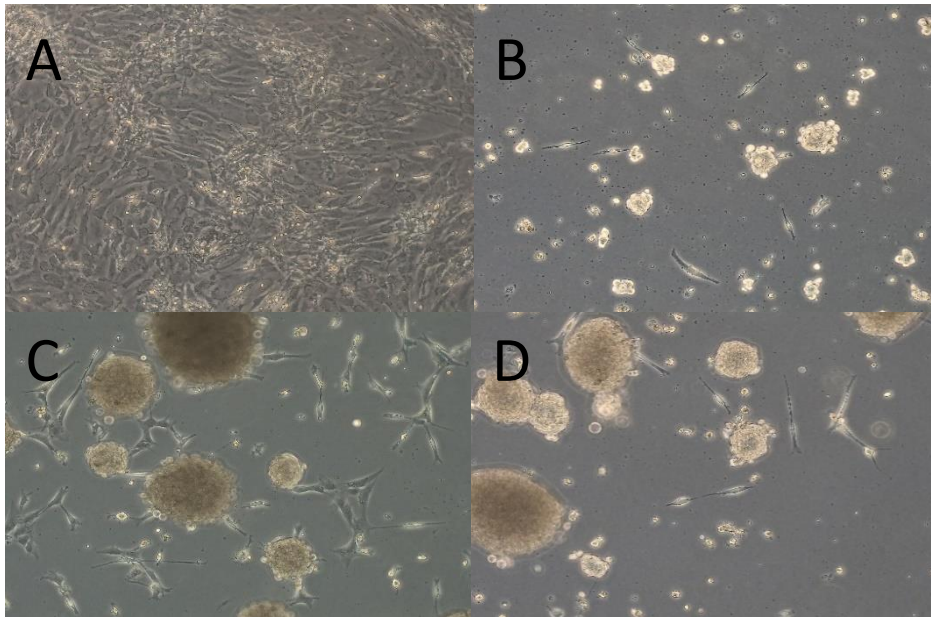


Figura 7. Imágenes de microscopía de contraste de fases. **(A)** Aspecto del cultivo de ADSCs cultivadas en medio Alpha-MEM durante 4 días, crecidas y confluentes, con aspecto fibroblástico; **(B)** aspecto del cultivo de ADSCs cultivadas en medio mTeSR™ Plus durante 4 días, con muy pocas células pegadas y la mayoría circulares formando agrupaciones; **(C)** aspecto de las ADSCs sembradas en medio mTeSR™ en la placa 2 durante 2 días y **(D)** 5 días, formando agrupaciones más grandes, debido a la mayor cantidad de ADSCs sembradas en los pocillos de la placa de 12 pocillos. Durante 2 días de cultivo se observa una cantidad de células pegadas de aspecto fibroblástico, que desaparecen a los 5 días.

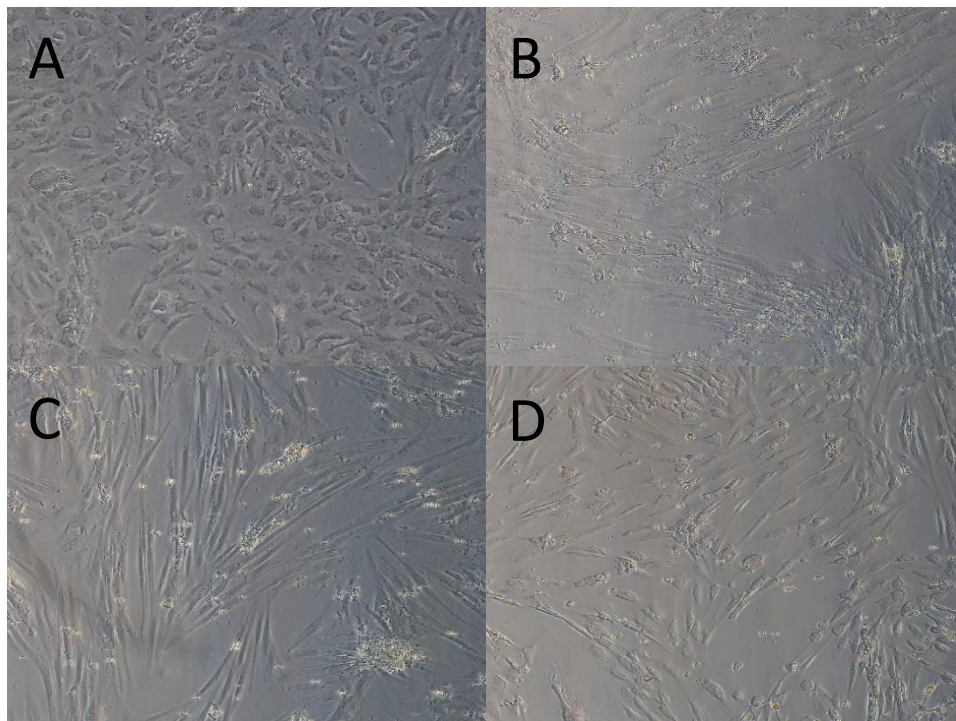


Figura 8. Imágenes de microscopía de contraste de fases. **(A)** ADSCs a día 0 de diferenciación. **(B)** Aspecto de los cultivos tratados con el kit STEMdiff, **(C)** STEMdiff + 5-AzaC 10 μ M y **(D)** 5-AzaC 10 μ M, durante 6 días de cultivo.

Durante los primeros días del proceso de diferenciación no se detectaron cambios relevantes en la morfología de las ADSCs. No fue hasta la exposición al medio STEMdiff™ C que se pudieron observar los primeros cambios significativos, principalmente en las células que recibieron el tratamiento 2, que adquirieron una forma más fina y alargada, como se puede observar en la figura 8C. Las ADSCs que recibieron los tratamientos por separado mostraron un ligero cambio morfológico, pero menos pronunciado que combinando ambos tratamientos, ya que su aspecto se mantuvo un poco más fibroblástico (figuras 8B y 8D), con un aspecto intermedio entre las ADSCs sin diferenciar (figura 8A) y las del tratamiento combinado.

Con el paso del tiempo, la morfología y agrupación de las células en cultivo fue variando. En el caso de la diferenciación con 5-AzaC, el aspecto se mantuvo más o menos estable a lo largo del tiempo, similar al de las ADSCs y el de los cardiomiocitos, tal como muestran las figuras 9C, 9F y 9I. El tratamiento con el medio de mantenimiento STEMdiff™ indujo una cierta agrupación celular de aspecto estrellado, alrededor de la cual aparecían células finas y alargadas, siendo más pronunciado este efecto en el cultivo que recibió sólo el tratamiento con STEMdiff™ que en el cultivo que también se trató con 5-AzaC 10 µM (figuras 9A, 9D y 9G vs 9B, 9E y 9H). Un aspecto común de todos los pocillos de la placa, independientemente del tratamiento, es que a medida que avanzó el tiempo de cultivo aparecían menos células pegadas, probablemente debido a los cambios de medio realizados, en los cuales se podrían haber arrastrado células al eliminar el medio anterior, y despegar otras al añadir el medio nuevo, causa de que finalmente estuvieran en suspensión y se eliminaran. El momento crítico en el que se observó una disminución más radical del número de células corresponde a los 22-24 días de tratamiento, como se aprecia en las figuras 9J, 9K y 9L, si bien el kit permite el mantenimiento de estos cardiomiocitos durante periodos superiores a 1 mes. Queda así demostrado que para células mesenquimales el periodo de mantenimiento es más reducido que para embrionarias, aguantando una media de 3 semanas antes de producirse una mayor tasa de muerte celular.

5.3.2. ADSCs de pase 2

En la placa 3 no se observó ninguna diferencia destacable con respecto a la placa 1.

En cuanto a la placa 4, sembrada con medio mTeSR™ Plus y tratada con poli-L-lisina, se observó de nuevo la no adherencia y formación de agregados, esta vez tubulares y de tamaño macroscópico, aproximadamente de 2 cm de longitud. Mediante microscopía se comprobó que no había células pegadas en el fondo de los pocillos, se encontraban en su totalidad formando los macroagregados (figura 10).

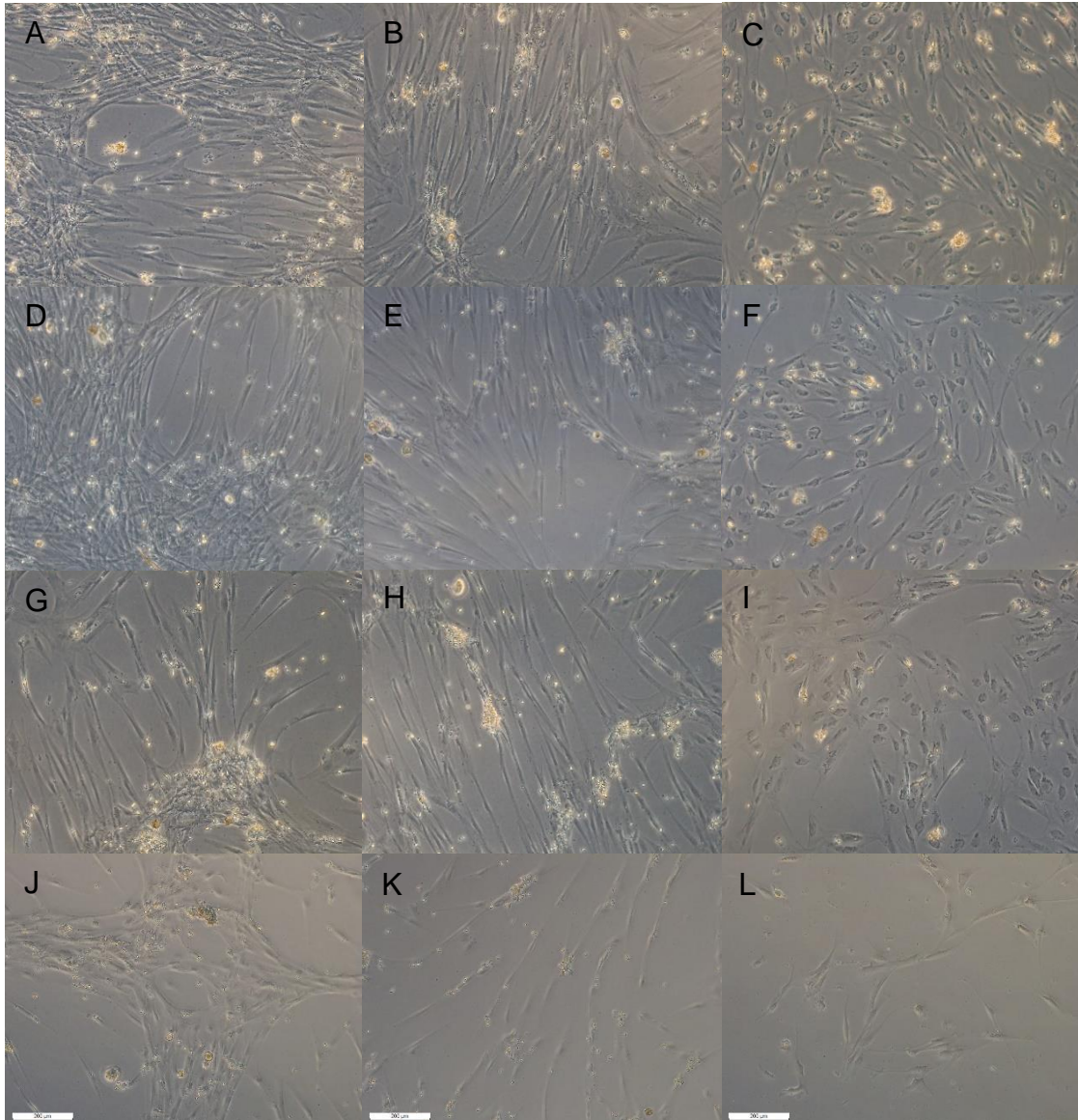


Figura 9. Evolución decreciente en cantidad de células en proceso de diferenciación tratadas con STEMdiff™ durante 12 (A), 14 (D), 18 (G) y 24 días (J); con STEMdiff™ + 5-AzaC 10 μ M durante 12 (B), 14 (E), 18 (H) y 24 días (K); y con 5-AzaC 10 μ M durante 12 (C), 14 (F), 18 (I) y 24 días (L).

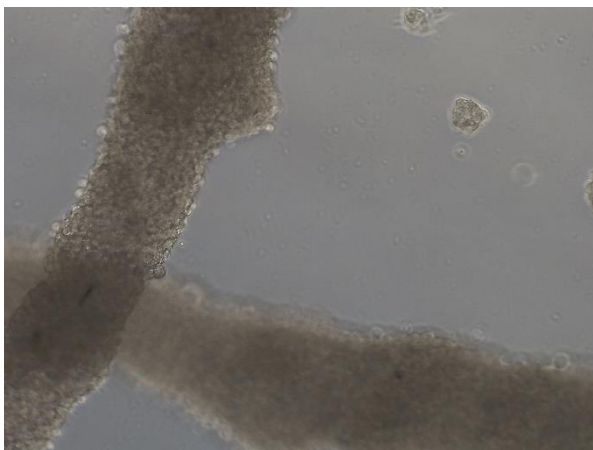


Figura 10. Aspecto del cultivo de ADSCs con medio mTeSR™ Plus en pocillos tratados con poli-L-lisina, en forma de agregados tubulares de gran tamaño.

5.4. Extracción celular

Finalizado el tratamiento de diferenciación fue necesario extraer el contenido celular, para así obtener las proteínas celulares y determinar si realmente había ocurrido la diferenciación hacia cardiomiocitos.

Como control negativo de expresión de proteína cardiaca en los ensayos se utilizaron ADSCs procedentes del mismo paciente, de pase 6, que se fueron subcultivando hasta que se completara la diferenciación. Del frasco de cultivo de 75 cm² se obtuvieron 1,32 x 10⁶ células, cantidad menor que en los pases iniciales, donde las células madre eran más jóvenes y ocupaban un menor espacio, por lo que cabía una mayor cantidad de ellas en el frasco.

De las muestras a analizar existía un duplicado para cada cultivo y tipo de diferenciación, pero se obtuvieron muy pocas células, lo que no permitió realizar todos los ensayos previstos. Se realizó únicamente un ELISA para detectar cTnI.

5.5. ELISA

Algunas proteínas cardiacas típicas del tejido cardiaco, como la subunidad I de la troponina (cTnI)²⁰ y GATA4¹³, se pueden utilizar como marcadores de diferenciación.

Las muestras obtenidas en el apartado anterior se sometieron a un test ELISA de tipo sándwich, mediante el cual se determinó la concentración de proteína cTnI presente en las células obtenidas de los diversos tratamientos descritos. Se realizó una recta de calibrado obtenida con estándares de concentraciones conocidas (0, 31,3, 62,5, 125, 250, 500, 1.000 y 2.000 pg/mL), obteniendo su densidad óptica a 450 nm, como se muestra en la figura 11. Se realizó un duplicado para cada muestra, excepto para los extractos celulares a ensayar, cuyo pequeño volumen y gran dilución no permitirían detectar la aparentemente poca concentración de proteína presente. Esto puede interferir a la hora de la reproducibilidad del experimento. En la tabla A2 del anexo se recogen los valores de densidad óptica. El estándar 1, de concentración 2.000 pg/mL, no entró en el rango de medición. A su vez, pequeñas desviaciones en los estándares de mayor concentración resultan en grandes variaciones de concentración en las muestras a analizar, ubicadas dentro del rango más bajo de concentración, por lo que se eliminaron los estándares 2 y 3, de 1.000 y 500 pg/mL, respectivamente, obteniendo la recta de calibrado que se muestra en la figura 10.

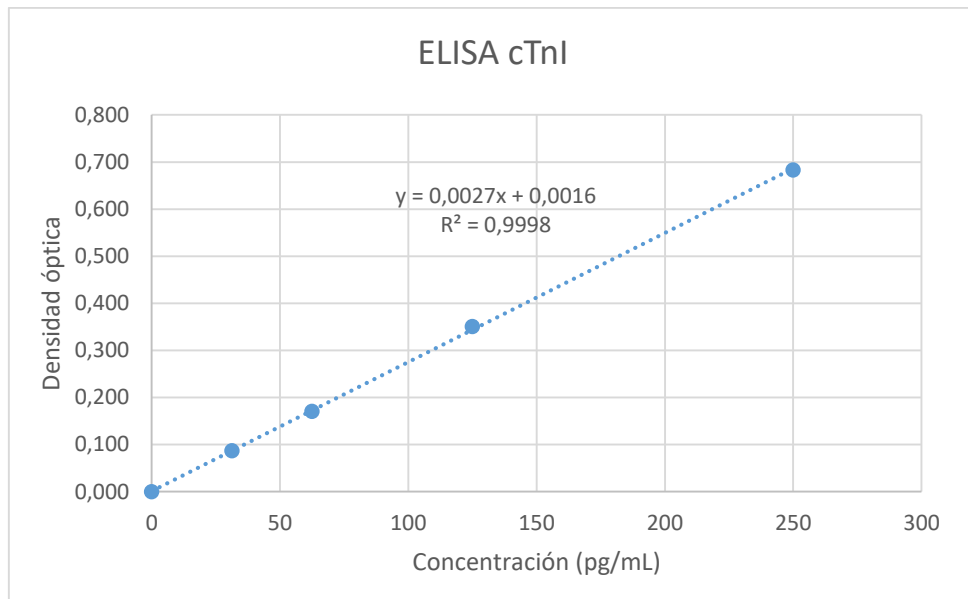


Figura 11. Recta de calibrado originada a partir de los duplicados de los estándares de cTnI preparados con tampón de extracción 1x.

Tipo de tratamiento	STEMdiff™	STEMdiff™ + 5-AzaC	5-AzaC
Concentración cTnI (pg/mL)	0	9,41	4,96

Tabla 1. Concentración de cTnI detectada mediante la técnica de ELISA.

La concentración de cada muestra de extracto celular queda reflejada en la tabla 1. Como se puede observar, el test da negativo para células tratadas con STEMdiff™ en solitario, un valor intermedio en células tratadas con 5-AzaC (4,96 pg/mL) y un valor de casi el doble (9,41 pg/mL) en células tratadas con la combinación de STEMdiff™+ 5-AzaC. Las muestras de sobrenadantes de los cultivos celulares dieron una señal negativa.

6. Discusión

El objetivo primordial de este trabajo era la puesta a punto de protocolos de diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos. Para ellos, se ensayó el kit comercial STEMdiff™, que está indicado para la diferenciación a cardiomiocitos de células embrionarias o células madre totipotentes¹⁴, pero que no se había ensayado sobre ADSCs. Los resultados obtenidos indican que, por sí solo este kit no es adecuado para promover esta diferenciación. Otro compuesto que se ha descrito que induce diferenciación de células madre a cardiomiocitos es 5-AzaC, aunque los resultados son contradictorios^{11,12,13}. En uno de estos estudios, realizado en ratas, se demostró en realidad que 5-AzaC consigue la diferenciación a cardiomiocitos sobre células madre embrionarias¹³. En nuestras manos, el uso de 5-AzaC como agente único, tampoco consiguió unos niveles apreciables de diferenciación, sin embargo, se ha observado que la combinación de ambos tratamientos produce cambios morfológicos en las células estables en el tiempo y que serían compatibles con una diferenciación a cardiomiocitos. Esta diferenciación, aunque parcial, se ha demostrado por la expresión de niveles detectables del marcador cardíaco cTnI. Esta observación es novedosa y puede tener utilidad en el campo de la investigación, pero también podría tener aplicaciones clínicas y utilizarse en procesos controlados de regeneración cardíaca.

En cualquier caso, se deberían repetir estos experimentos, utilizando también otro marcador intracelular de cardiomiocitos como GATA4 y estimar por citometría de flujo el porcentaje de células que efectivamente se diferencian a cardiomiocitos en estos cultivos.

7. Conclusiones

Se pueden extraer las siguientes conclusiones de los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto:

- La adhesión y proliferación de las ADSCs fue posible con el uso del medio Alpha-MEM, pero se vio comprometida con el uso del medio mTeSR™ Plus. Esto indica que, a pesar de contener FGF2, el medio no cumple con las necesidades de esta línea celular para su proliferación.
- El uso del kit STEMdiff™ lleva a las ADSCs a modificar su morfología y sus uniones intercelulares (más alargadas y entretrejidas). El uso de 5-azacitidina no modifica sustancialmente la morfología de las ADSCs. La combinación de STEMdiff™ con 5-azacitidina produce una diferenciación parcial hacia una morfología compatible con la de cardiomiocitos.
- Esta diferenciación parcial a cardiomiocitos inducida por STEMdiff™ + 5-azacitidina se ha demostrado por la expresión del marcador cardíaco cTnl.

The following conclusions can be drawn from the results obtained throughout this project:

- ADSC's attachment and proliferation were possible using Alpha-MEM medium, but were compromised with mTeSR™ Plus medium. This shows that, despite it contains FGF2, this medium does not meet this cell line's needs for its proliferation.
- The use of STEMdiff™ kit leads ADSC to modify their morphology and their intercellular junctions (more elongated and interwoven). The use of 5-azacytidine does not modify its morphology substantially. The combination of STEMdiff™ and 5-azacytidine produces a partial differentiation into a more compatible morphology with cardiomyocytes.
- This partial differentiation into cardiomyocytes induced by treatment by STEMdiff™ + 5-azacytidine was proved by the expression of the cardiac marker cTnl.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- <https://www.who.int/>, consultado 07/08/2019
- 2.- Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8801-05.
- 3.- Bueno-Gonzalez AM, Perez-Vela JL, Hernández F, Renesa E, Arribasa P, Corresa MA, Gutiérrez J, Perales N. Diagnóstico y alternativas terapéuticas en la isquemia miocárdica aguda perioperatoria en cirugía coronaria. *Med Intensiva*. 2010; 34(1), 64–73.
- 4.- Kalra K, Tomar PC. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *AJPCT*. 2014; 919-930.
- 5.- Morgani SM, Canham MA, Nichols J, Sharov AA, Portero Migueles R, Ko MSH, Brickman JM. Totipotent Embryonic Stem Cells Arise in Ground-State Culture Conditions. *Cell Rep*. 2013; 3(6), 1945-1957.
- 6.- Hayashi Y, Furue MK, Tanaka S, Hirose M, Wakisaka N, Danoo H, Ohnuma K, Oeda S, Aihara Y, Shiota K, Ogura A, Ishiura S, Asashima M. BMP4 induction of trophoblast from mouse embryonic stem cells in defines culture conditions on laminin. *In Vitro Cellular & Dev Biology*. 2010; 46(5), 416-430.
- 7.- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. *Transplantation*. 1974; 17(4), 331-340.
- 8.- Busser H, De Bruyn C, Urbain F, Najjar M, Pieters K, Raicevic G, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L. Isolation of Adipose-Derived Stromal Cells Without Enzymatic Treatment: Expansion, Phenotypical, and Functional Characterization. *Stem Cells Dev*. 2014; 23(19): 2390–2400.
- 9.- <https://lyposmol.es/>
- 10.- Qian Q, Qian H, Zhang X, Zhu W, Yan Y, Ye S, Peng X, Li W, Xu Z, Sun L, Xu W. 5-Azacytidine Induces Cardiac Differentiation of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells by Activating Extracellular Regulated Kinase. *Stem Cells and Development* 2012; 21(1) 67-75.

- 11.- Wan Safwani WKZ, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. 5-Azacytidine is insufficient for cardiogenesis in Human Adipose-Derived Stem Cells. *Journal of Negative Results in BioMedicine* volume. 2012; 11(3).
- 12.- Kakkar A, Nandy SB, Gupta S, Bharagava B, Airan B, Mohanty S. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells are better respondents to TGF β 1 for in vitro generation of cardiomyocyte-like cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2019; 1-14.
- 13.- Blázquez Martínez A. Estudio de subpoblaciones celulares en la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo humano con características de célula madre y con diverso potencial de diferenciación. Tesis doctoral por la UAM. 2015.
- 14.- StemCell Technologies. Ficha técnica STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation and Maintenance Kits, referencia 05010.
- 15.- Science Cell. Ficha técnica cardiomiocitos humanos adultos.
- 16.- Lotz S, Goderie S, Tokas N, Hirsch SE, Ahmad F, Corneo B, Le S, Banerjee A, Kane RS, Stern JH, Temple S, Fasano CA. Sustained Levels of FGF2 Maintain Undifferentiated Stem Cell Cultures with Biweekly Feeding. *Plos One*. 2013; 8(2)
- 17.- StemCell Technologies. Ficha técnica Y-27632, referencia 72302.
- 18.- InvivoGen. Ficha técnica Plasmotest™. Referencia rep-pt1.
- 19.- Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on poly lysine-coated surface. Yavin E, Yavin Z. *The Journal of Cell Biology*. 1974; 62, 540-546.
- 20.- Yang W, Zheng H, Wang Y, Lian F, Hu Z, Xue S. Nesprin-1 has key roles in the process of mesenchymal stem cell differentiation into cardiomyocyte-like cells in vivo and in vitro. *Molecular Medicine Reports*. 2015; 11, 133-142

ANEXO

	1	2	3	4	5
A	St. 8	St. 4	Control ADSCs	SS P1 kit	SS P2 kit + 5-AzaC
B	St. 8	St. 4	Kit	SS P1 kit	SS P2 kit + 5-AzaC
C	St. 7	St. 3	Kit + 5-AzaC	SS P1 kit + 5-AzaC	SS P2 5-AzaC
D	St. 7	St. 3	5-AzaC	SS P1 kit + 5-AzaC	SS P2 5-AzaC
E	St. 6	St. 2	Control Alpha-MEM	SS P1 5-AzaC	
F	St. 6	St. 2	Control Alpha-MEM	SS P1 5-AzaC	
G	St. 5	St. 1	Control medio mant.	SS P2 kit	
H	St. 5	St. 1	Control medio mant.	SS P2 kit	

Tabla A1. Distribución de las muestras en la placa del test ELISA. St.: estándar, SS: sobrenadantes, P1: células de pase 1, P2: células de pase 2.

	1	2	3	4	5
A	0,052	0,724	0,101	0,059	0,080
B	0,056	0,751	0,103	0,064	0,086
C	0,144	1,364	0,128	0,067	0,095
D	0,138	1,342	0,116	0,062	0,076
E	0,223	2,445	0,057	0,064	
F	0,226	2,503	0,062	0,059	
G	0,408	***	0,098	0,069	
H	0,402	***	0,069	0,062	

Tabla A2. Test ELISA. Densidad óptica recogida a una longitud de onda de 450 nm.